

Adenoviraler Transfer von anti-MDR1 shRNAs

Implikationen für die Gentherapie *multidrug*-resistenter Tumoren

DISSERTATION

zur Erlangung des akademischen Grades

doctor rerum naturalium

(Dr. rer. nat.)

im Fach Biologie

eingereicht an der

Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

der Humboldt-Universität zu Berlin

von

Diplom-Biologe

ALEXANDER KASZUBIAK

geboren am 27.01.1978 in Lauchhammer

Präsident der Humboldt-Universität zu Berlin

Prof. Dr. Christoph Marksches

Dekan der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät I

Prof. Dr. Christian Limberg

Gutachter: 1. Prof. Dr. Andreas Hermann
 2. Prof. Dr. Dr. Hermann Lage
 3. PD Dr. Carsten Denkert

Tag der mündlichen Prüfung: 12.07.2007

ZUSAMMENFASSUNG

Tumoren entwickeln während einer Chemotherapie häufig Resistenzen gegen strukturell und funktionell unabhängige Zytostatika - ein Phänomen, das als *Multidrug*-Resistenz (MDR) bezeichnet wird und die Hauptursache für das Scheitern einer Chemotherapie ist. Die klassische MDR ist mit einer Überexpression des ABC-Transporters MDR1/P-gp assoziiert. Der vorliegende gentherapeutische Ansatz beinhaltet eine selektiv gegen MDR1/P-gp gerichtete und vor allem effiziente Strategie zur Überwindung des MDR-Phänotyps humaner Tumorzellen.

Basierend auf der Integration verschiedener anti-MDR1 shRNA Expressionskassetten in adenovirale Gentherapievektoren, konnte mit Hilfe der RNA-Interferenz Technologie (RNAi) die MDR1/P-gp Expression selektiv inhibiert werden. Mittels des hoch effizienten Adenovirus Ad5U6/MDR-C wurde die MDR1 mRNA- sowie Protein-Expression soweit reprimiert, dass eine vollständige Aufhebung der biologischen Aktivität der Effluxpumpe MDR1/P-gp und eine Reversion des Resistenz Phänotyps gegenüber den typischen MDR1/P-g-Substraten Daunorubicin (87 % in EPP85-181RDB bzw. 66 % in EPG85-257RDB) sowie Vincristin (96 % bzw. 82 %) resultierte.

Zudem wurde gezeigt, dass Δ E1-deletierte und damit replikationsinkompetente Adenoviren in *multidrug*-resistenten Tumorzellen replizieren können. Damit wirkt Ad5U6/MDR-C in MDR-Tumorzellen onkolytisch. Zwar konnte die Adenovirusreplikation mit dem DNA-Synthese-Hemmer Hydroxyurea (HU) zu 94 % inhibiert werden, die anti-MDR1 Effizienz von Ad5U6/MDR-C wurde dennoch erhöht (+5 % in HeLaRDB, +12 % in EPG85-257RDB), was für eine erfolgreiche und niedrig dosierte Ad-Gentherapie *multidrug*-resistenter Tumoren in Kombination mit HU ausgenutzt werden kann.

Außerdem wurde der entscheidende Einfluss des regulatorischen Proteins YB-1 auf die selektive Replikation von Ad5U6/MDR-C in MDR1/P-gp überexprimierenden Tumorzellen gezeigt. Eine 90 %ige Inhibition von YB-1 bedingt eine Hemmung der Adenovirusreplikation um 70 % und damit eine verringerte Effizienz der RNAi-vermittelten Inhibition von MDR1/P-gp um 40 %.

Mit diesem gentherapeutischen Ansatz können die Effekte der YB-1-abhängigen und der die Zelllyse bedingenden Adenovirusreplikation sowie der anti-MDR1 shRNA vermittelten Chemosensitivierung kombiniert und zu einer verbesserten Eliminierung von MDR-Tumorzellen führen.

Heinrich! Mit graut's vor dir.

MARGARETE

Johann Wolfgang Goethe

INHALTSVERZEICHNIS

ZUSAMMENFASSUNG	I
------------------------------	----------

INHALTSVERZEICHNIS	III
---------------------------------	------------

ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VIII
------------------------------------	-------------

TABELLENVERZEICHNIS	X
----------------------------------	----------

1 EINLEITUNG	1
---------------------------	----------

1.1 Somatische Gentherapie	1
----------------------------------	---

1.2 Chemotherapeutische Behandlung maligner Tumoren	2
---	---

1.2.1 Multidrug-Resistenz (MDR)	3
---------------------------------------	---

1.2.1.1 MDR1/P-Glykoprotein (MDR1/P-gp)	4
---	---

1.2.1.1.1 Inhibition von MDR1/P-gp mittels RNA-Technologie.....	5
---	---

1.3 Adenovirale Vektoren in der Gentherapie	6
---	---

1.3.1 Bedeutung des Coxsackie-Adenovirus-Rezeptors in der Ad-Gentherapie	7
--	---

1.4 Adenoviren	7
----------------------	---

1.4.1 Adenoviraler Lebenszyklus.....	8
--------------------------------------	---

1.5 Der Faktor YB-1	12
---------------------------	----

1.5.1 Lokalisation von YB-1	12
-----------------------------------	----

1.5.2 Funktion von YB-1.....	13
------------------------------	----

1.6 ZIEL DER ARBEIT	16
---------------------------	----

2 MATERIAL	17
-------------------------	-----------

2.1 Chemikalien	17
-----------------------	----

2.2 Antikörper	19
----------------------	----

2.3 Enzyme.....	19
-----------------	----

2.4 Kits	20
----------------	----

2.5 Radionukleotide	20
---------------------------	----

2.6 Verbrauchsmaterialien	20
---------------------------------	----

2.7 Geräte	21
------------------	----

2.8 Software	22
--------------------	----

3	METHODEN	23
3.1	Zellen und Zellkultur.....	23
3.1.1	Kultivierung von humanen Zelllinien	23
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien.....	24
3.1.3	Transfektion von humanen Zelllinien	24
3.1.3.1	Transfektion von HEK-293A	24
3.1.3.2	Stabile Transfektion von humanen Tumorzelllinien.....	24
3.1.4	In vitro Zytotoxizitätsassay mittels Sulphorhodamin B.....	25
3.1.5	Durchflusszytometrie	26
3.2	Molekularbiologische Methoden.....	27
3.2.1	Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration.....	27
3.2.2	Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide	27
3.2.3	Enzymatische Modifikation und Fällung von DNA	28
3.2.4	Polymerasekettenreaktion (PCR)	28
3.2.5	Punktgerichtete Mutagenese mittels PCR	30
3.2.6	Reverse Transkription	31
3.2.7	Quantitative <i>real time</i> RT-PCR.....	31
3.2.8	Aufreinigung von PCR-Produkten	32
3.2.9	Agarose-Gelelektrophorese	32
3.2.10	Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten	32
3.2.11	DNA-Sequenzierung	33
3.2.12	Isolierung zellulärer DNA	33
3.2.13	Southern Blot Analyse	33
3.2.13.1	Kapillartransfer.....	34
3.2.13.2	Radioaktive Sondenmarkierung	34
3.2.13.3	Radioaktive Hybridisierung	34
3.2.14	Isolation zellulärer RNA	34
3.2.15	Northern Blot Analyse	35
3.2.16	siRNA Expressionsnachweis.....	35
3.2.16.1	Isolation von miRNA	35
3.2.16.2	Auftrennung und Transfer von miRNA	35
3.2.16.3	Radioaktive Sondenmarkierung	36
3.2.16.4	Radioaktive Hybridisierung	36
3.2.17	Isolierung zellulärer Proteine	36

3.2.18	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	37
3.2.19	Western Blot Analyse.....	37
3.2.19.1	Auftrennung und Transfer von Proteinen.....	37
3.2.19.2	Antikörper-Reaktion und Detektion mittels Chemolumineszenz	38
3.2.20	Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen	39
3.3	Bakterien und Bakterienkultur	40
3.3.1	Transformation	40
3.3.1.1	Herstellung chemokompetenter <i>E. coli</i>	40
3.3.1.2	Transformation chemokompetenter <i>E. coli</i>	40
3.3.1.3	Herstellung elektrokompeter <i>E. coli</i>	41
3.3.1.4	Transformation elektrokompeter <i>E. coli</i>	41
3.3.2	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	41
3.4	RNAi-Technologie	42
3.4.1	H1- und U6-Promotor	42
3.4.2	RNAi-Mechanismus.....	43
3.5	Adenovirale Methoden.....	45
3.5.1	Verwendete Adenoviren.....	45
3.5.2	Produktion rekombinanter Adenoviren.....	46
3.5.3	Herstellung aufgereinigter hochkonzentrierter Virusstammlösungen.....	49
3.5.4	Konzentrationsbestimmung der Virusstammlösungen.....	49
3.5.4.1	Bestimmung der Viruspartikelkonzentration	49
3.5.4.2	Bestimmung der Konzentration infektiöser Viruspartikel (Plaque Assay) ..	50
3.5.5	Adenovirale Transduktion <i>multidrug</i> -resistenter Tumorzellen.....	51
3.5.6	Darstellung des CPE mittels Kristallviolettfrbung.....	51
4	ERGEBNISSE	52
4.1	Etablierung Zervixkarzinomzelllinie mit MDR-Phänotyp.....	52
4.1.1	MDR1/P-gp-Expression in HeLaRDB.....	52
4.1.2	Kreuzresistenzen der HeLaRDB	53
4.2	CAR-Expression der verwendeten Tumorzellmodelle	54
4.3	Konstruktion von anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenovirusvektoren.....	56
4.3.1	$\Delta E1$ der rekombinanten Adenoviren.....	56
4.3.2	Nachweis der prozessierten anti-MDR1 siRNAs.....	57
4.4	Inhibition der MDR1/P-gp Expression	58

4.4.1	Inhibition der MDR1 mRNA Expression.....	59
4.4.2	Inhibition der MDR1/P-gp Protein Expression.....	63
4.4.3	Steigerung der Akkumulation von Daunorubicin	65
4.4.4	Reversion des <i>multidrug-resistant</i> (MDR)-Phänotyps.....	67
4.4.4.1	Zytotoxizität der infizierten Tumorzellen gegenüber Daunorubicin.....	67
4.4.4.2	Zytotoxizität der infizierten Tumorzellen gegenüber Vincristin.....	69
4.4.4.3	Bestätigung der Spezifität von Ad5U6/MDR-C am Beispiel von Cisplatin	70
4.5	Replikation von Δ E1-Adenoviren in MDR-Tumorzellen	72
4.5.1	Darstellung des CPE mittels Kristallviolett-färbung.....	72
4.5.2	Darstellung der Adenovirus DNA-Replikation.....	74
4.5.3	Hydroxyurea verringert adenovirale DNA-Replikation.....	75
4.6	YB-1-Expression in Tumorzellen	80
4.7	Repression des Y-box Proteins 1 (YB-1).....	81
4.7.1	Inhibition der mRNA und Protein Expression von YB-1	82
4.7.2	Keine Beeinflussung der MDR1 Expression nach YB-1-Repression.....	83
4.7.3	Doxycyclin und adenovirale Transduktion fördern die YB-1 Expression.....	84
4.8	Unterdrückung der adenoviralen Replikation nach YB-1 Repression.....	85
4.9	Reduktion des adenoviral vermittelten RNAi Effekts nach YB-1 Repression	91
5	DISKUSSION	94
5.1	Idee und Hintergrund des adenoviralen Transfers von anti-MDR1 shRNAs	94
5.2	Bewertung der anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren.....	96
5.2.1	Funktionelle Untersuchungen der infizierten Tumorzellen	99
5.2.1.1	Akkumulationsverhalten der infizierten Tumorzellen	99
5.2.1.2	Resistenzverhalten der infizierten Tumorzellen.....	99
5.3	Ad5U6/MDR-C als Gentherapievektor.....	100
5.4	Replikation von Δ E1-Adenoviren	101
5.4.1	HU-Chemotherapie fördert die Effizienz der Ad-Gentherapie	103
5.5	Das Y-Box Protein 1	104
5.5.1	Bedeutung von YB-1 in MDR-Tumoren	104
5.5.2	Bedeutung von YB-1 in der adenoviralen Gentherapie von MDR-Tumoren	107
5.6	Ausblick	109

6	BIBLIOGRAPHIE	110
7	ANHANG	126
8	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS.....	127
	LEBENS LAUF	128
	PUBLIKATIONEN	129
	DANKSAGUNG.....	131
	SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG	132

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abb. 1: In klinischen Gentherapiestudien behandelte Erkrankungen	2
Abb. 2: Verwendete Vektoren in klinischen Gentherapiestudien	6
Abb. 3: Genomkarte von Wildtyp Ad5 mit den frühen Regionen (E) und der gesamten späten Region	8
Abb. 4: Lokalisation und zelluläre Funktionen von YB-1 (modifiziert nach Kohno <i>et al.</i> , 2003).....	15
Abb. 5: Punktgerichtete Mutagenese zur Einführung einer <i>EcoRV</i> -Schnittstelle	31
Abb. 6: Schematische Übersicht der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz	44
Abb. 7: Produktion rekombinanter Viren.....	48
Abb. 8: MDR1/P-gp Genexpressionsanalyse HeLaRDB.....	52
Abb. 9: Kreuzresistenz der HeLaRDB gegenüber strukturell nicht verwandter Zytostatika...	53
Abb. 10: CAR-mRNA Expression der verwendeten Tumorzelllinien.....	55
Abb. 11: Nachweis der E1A-Deletion von Ad5U6/MDR-C.....	57
Abb. 12: Nachweis der prozessierten anti-MDR1 siRNAs.....	58
Abb. 13: Inhibition der MDR1 mRNA Expression durch anti-MDR1 shRNA exprimierende Adenoviren	60
Abb. 14: Keine Inhibition der MDR1 mRNA Expression durch Ad5U6/LacZ.....	61
Abb. 15: Inhibition der MDR1 mRNA Expression durch anti-MDR1 shRNA Adenoviren nach 5 Tagen	62
Abb. 16: Inhibition der MDR1/P-gp Protein Expression durch anti-MDR1 shRNA Adenoviren	64
Abb. 17: Daunorubicin Akkumulation, 3 Tage Postinfektion (nach Kaszubiak <i>et al.</i> , 2007) .	66
Abb. 18: Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-C und Daunorubicin	67
Abb. 19: Keine Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-D und Daunorubicin ..	68
Abb. 20: Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-C und Vincristin	69
Abb. 21: Zytotoxizitätsassay mit Ad5U6/MDR-C bzw. Ad5U6/LacZ und Cisplatin	70
Abb. 22: Zytopathischer Effekt (CPE) nach Transduktion mit AdU6/MDR-C.....	73
Abb. 23: EPP85-181RDB und EPG85-257RDB unterstützen adenovirale DNA-Replikation	74
Abb. 24: 5 mM Hydroxyurea (HU) verringert adenovirale DNA-Replikation.....	76
Abb. 25: mittels Hydroxyurea (HU) reduzierte adenovirale Replikation	78
Abb. 26: mittels HU reduzierte Ad-Replikation und ihr Einfluss auf die anti-MDR1 RNAi..	79
Abb. 27: Immunzytochemischer Nachweis von YB-1	80

Abb. 28: TetR vermittelte Regulation der anti-YB-1 shRNA Transkription (nach Hillen und Berens, 2002)	81
Abb. 29: Induktion der YB-1 Repression mittels Doxycyclin	82
Abb. 30: Stabile Repression von YB-1 über maximal 20 Tage	84
Abb. 31: Doxycyclin und adenovirale Transduktion steigern die YB-1 mRNA Expression ..	85
Abb. 32: YB-1 Repression bedingt verringerte Replikationseffizienz von Adenoviren.....	86
Abb. 33: YB-1 Repression hemmt die Produktion von infektiösen Adenovirus-Nachkommen	88
Abb. 34: Immunzytochemischer Nachweis der YB-1 Repression und Hemmung der Ad-Replikation	90
Abb. 35: Reduktion des adenoviral vermittelten RNAi Effekts nach YB-1 Repression	92
Abb. 36: Kontrolle auf Spezifität von Ad5U6/MDR-C	93
Abb. 37: Plasmide zur Konstruktion rekombinanter Adenoviren.....	126

TABELLENVERZEICHNIS

Tab. 1: <i>Top-</i> und <i>Bottom strand</i> Oligonukleotide für Integration in pENTR/U6	27
Tab. 2: Oligonukleotide für PCR, alphabetisch geordnet	29
Tab. 3: Oligonukleotide für Sequenzierung, alphabetisch geordnet	33
Tab. 4: Oligonukleotide für radioaktive Hybridisierung.....	36
Tab. 5: Primär- und Sekundärantikörper.....	38
Tab. 6: Verwendete Bakterienstämme	40
Tab. 7: anti-MDR1 und anti-LacZ Zielsequenzen auf der jeweiligen mRNA.....	46
Tab. 8: Kreuzresistenzen der HeLaRDB.....	54
Tab. 9: Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-C.....	71

1 EINLEITUNG

1.1 Somatische Gentherapie

Das Konzept der Gentherapie ist klassisch definiert als die Einbringung von genetischem Material in Körperzellen (Morgan und Anderson, 1993). Die neue Erbinformation soll den Phänotyp von beispielsweise Tumorzellen so verändern, dass sie absterben oder durch Medikamente oder das Immunsystem besser erkannt werden können.

Prinzipiell kommen bei der somatischen Gentherapie drei verschiedene Behandlungsformen in Betracht (Anderson, 1998): die *ex vivo*-Therapie, bei der die zu behandelnden Zellen zuvor dem Organismus entnommen und nach Behandlung wieder reimplantiert werden; die *in situ*-Therapie, hier wird das Therapeutikum direkt in das kranke Organ oder den Tumor injiziert; und die *in vivo*-Therapie, bei der das genetische Material systemisch verabreicht wird.

Die Bedeutung dieser Gentherapieansätze wird in der Zukunft zweifellos zunehmen - besonders im Hinblick auf die kürzlich erfolgte Sequenzierung des gesamten menschlichen Genoms (Lander *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001) - obgleich kein gentherapeutischer Ansatz sich innerhalb der Krebstherapie bisher so bewährt hat, dass er traditionelle Methoden wie Operation, Chemotherapie oder Bestrahlung vollständig ersetzen kann. Welches Potential die Tumorgentherapie zur Ergänzung einer konventionellen Chemotherapie entwickeln kann, ist Hauptbestandteil der vorgelegten Arbeit.

Denn zu möglichen Erkrankungen, welche durch eine Kombination traditioneller Methoden und gentherapeutischer Strategien behandelbar werden könnten, zählen nicht nur die angeborenen (mono)genetischen Erkrankungen, sondern auch erworbene Erkrankungen wie neurologische, kardiovaskuläre, Infektions- sowie Tumorerkrankungen (Somia und Verma, 2000). Umfangreiche Studien belegen zahlreiche genetische Alterationen in Tumorzellen, die zumindest theoretisch ermöglichen sollten, mittels Gentherapie einzugreifen. Dies führte dazu, dass sich mittlerweile die Mehrheit (67 %) der klinischen Gentherapiestudien mit der Behandlung von Krebserkrankungen befasst (Abb. 1).

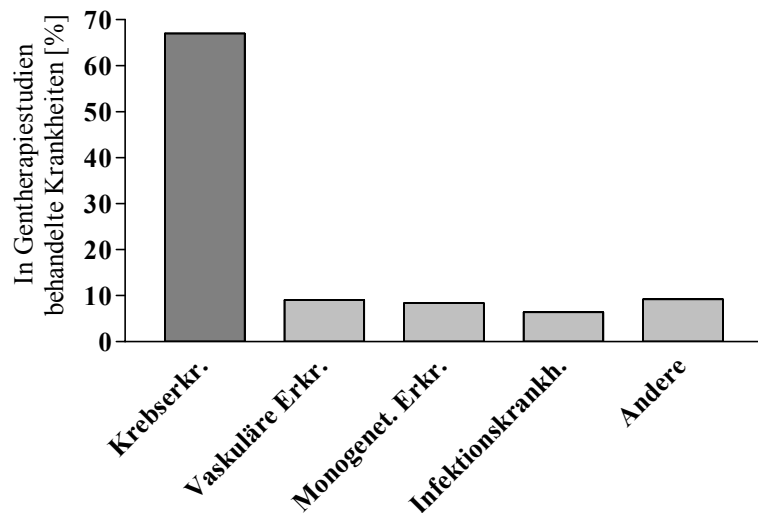


Abb. 1: In klinischen Gentherapiestudien behandelte Erkrankungen

Quelle: <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical> - Stand Januar 2007

Bevor auf den innerhalb dieser Arbeit vorgelegten gentherapeutischen Ansatz zur Behandlung von Tumorzellen näher eingegangen wird, beleuchten folgende Kapitel die damit potentiell ergänzbare antineoplastische Chemotherapie maligner Tumoren.

1.2 Chemotherapeutische Behandlung maligner Tumoren

Als Krebserkrankungen werden in der Medizin bösartige Tumoren bezeichnet, wobei im engeren Sinne maligne epitheliale Tumoren (Karzinome), hämatoonkologische Tumoren (Leukämien, Lymphome) und maligne mesenchymale Tumoren (Sarkome) gemeint sind. Die antineoplastische Chemotherapie stellt neben der chirurgischen Tumorentfernung und der Strahlentherapie eine der tragenden Säulen in der Behandlung dieser malignen Krebserkrankungen dar. Häufig werden in der adjuvanten Tumorthherapie sog. Zytostatika eingesetzt. Dieser Begriff umfasst eine chemisch heterogene Gruppe von zytotoxischen Substanzen, die die Teilung von Zellen verhindern oder verzögern. Zytostatika werden üblicherweise systemisch verabreicht, was auch bedeutet, dass das Absorptionsverhalten der Tumoren variiert. Einige Formen von Tumorerkrankungen bei denen eine Chemotherapie zu einer dauerhaften Heilung führen kann, sind beispielsweise Maligne Lymphome, Leukämien oder Tumoren des Kindesalters. Dagegen sprechen manche Tumorarten, wie zum Beispiel das Nierenzellkarzinom, das hepatozelluläre Karzinom oder gastrointestinale Stromatumoren, nur wenig auf eine Therapie mit Zytostatika an. Man spricht in diesem Falle von einer primären oder intrinsischen Resistenz des Tumors (Pastan und Gottesman, 1987). Zudem kann die

Chemotherapie dazu führen, dass die eingesetzten Zytostatika im Laufe der Behandlung ihre Wirksamkeit verlieren (sekundäre Resistenz). Wenn der Tumor gleichzeitig auf mehrere Zytostatika nicht mehr anspricht, wird dieses Phänomen als *Multidrug*-Resistenz (MDR) bezeichnet (erstmalig beschrieben von Biedler und Riehm, 1970).

1.2.1 Multidrug-Resistenz (MDR)

Die Resistenz von humanen malignen Tumoren gegen eine Behandlung mit zytotoxischen antineoplastischen Substanzen ist einer der Hauptgründe für den Misserfolg einer traditionellen Chemotherapie verschiedenster Tumortypen (Chan *et al.*, 1990; Chan *et al.*, 1991; Pirker *et al.*, 1991; Verelle *et al.*, 1991; Arceci, 1993; Baldini *et al.*, 1995).

In Analogie der Untersuchungen zur Antibiotikaresistenz in Mikroorganismen, ist die Erforschung der Zytostatikaresistenz von Tumoren auf die zellulären Resistenzmechanismen fokussiert. Derzeit sind drei Hauptmechanismen der Zytostatikaresistenz von Zellen bekannt (Szakács *et al.*, 2006):

- Erniedrigte Aufnahme wasserlöslicher Medikamente wie Folatantagonisten (z.B. Methotrexat) und Nukleosidanaloga (z.B. Gemcitabin), welche Transporter benötigen, um in die Zelle zu gelangen;
- Veränderungen der Zelle, die die Toxizitätskapazität der Zytostatika betreffen wie Änderung des Zellzyklus, verstärkte DNA-Reparatur und veränderter Zytostatika-metabolismus;
- Erhöhter ATP-abhängiger Auswärtstransport hydrophober Zytostatika wie Daunoblastin (4.4.4.1) und Vincristin (4.4.4.2), die über die Zellmembran durch Diffusion in die Zelle gelangen.

Der klassische *Multidrug Resistance* (MDR)-Phänotyp ist charakterisiert durch eine Reduktion der zellulären Akkumulation hydrophober Substanzen sowie durch eine Kreuzresistenz gegenüber Vincaalkaloiden, Anthrazyklinen, Epipodophyllotoxin-Derivaten oder Taxanen und ist damit mit letztgenanntem Mechanismus assoziiert.

Das zuerst identifizierte MDR-assoziierte Gen wurde nach dem Phänomen der *Multidrug*-Resistenz als *MDR1* benannt. Das Genprodukt ist ein integrales Glykoprotein der Plasmamembran (auch Permeabilitätsglykoprotein, MDR1/P-gp, P-170, PGY1, ABCB1). MDR1/P-gp gehört zur Superfamilie der ABC-Transporter (ATP-binding cassette), die in 7 Subfamilien (A-G) unterteilt ist (Dean *et al.*, 2001) und für den aktiven membranösen Transport verschiedenster Substrate verantwortlich ist.

1.2.1.1 MDR1/P-Glykoprotein (MDR1/P-gp)

Die Überexpression von MDR1/P-g ist mit der klassischen *Multidrug*-Resistenz in humanen malignen Tumoren assoziiert. MDR1/P-gp ist ein 170 kDa großes Transmembranprotein, das 1976 erstmals in Kolchizin-resistenten CHO-Zellen (*chinese hamster ovary*) beschrieben wurde und zählt zu den am besten untersuchten ABC-Transportern (Juliano *et al.*, 1976). Das humane MDR1/P-gp wird durch das auf dem Chromosom 7q21.1 gelegene Gen *MDR1* kodiert (Shen *et al.*, 1986) und spielt als Mitglied der ABC-Transporterfamilie bei der Eliminierung und Detoxifikation strukturell nicht verwandter Substanzen eine wichtige Rolle (Schinkel, 1997; Johnson *et al.*, 2001).

MDR1/P-gp wird als prognostischer Marker für die Beurteilung der Therapierbarkeit von Tumoren genutzt (Beck *et al.*, 1996; Alvarez *et al.*, 1996). Das *MDR1*-Gen ist empfänglich für transkriptionelle Aktivierung und Genamplifikation während der Selektion von zytostatikaresistenten Zellkulturen (Kohno *et al.*, 1994; van der Bliek *et al.*, 1988). Es wird als Stressantwort auf UV-Bestrahlung, antineoplastische Reagenzien, Herabsetzung der Serumkonzentration, Hitzeschock, Phosphataseinhibitoren und Phorbolesther in Zellkulturen (Uchiumi *et al.*, 1993; Kohno *et al.*, 1989; Chaudhary und Roninson, 1993; Osborn und Chambers, 1996; Tanimura *et al.*, 1992; Combates *et al.*, 1997) sowie *in vivo* während einer Chemotherapie überexprimiert (Goldstein *et al.*, 1989; Nakagawa *et al.*, 1997).

Die Hemmung von MDR1/P-gp wird seit über 20 Jahren erforscht, um eine Aufhebung der MDR zu erreichen (Thomas und Coley, 2003). Unterschiedlichste Strategien, um den P-Glykoprotein-abhängigen Resistenzphänotyp aufzuheben, wurden bereits entwickelt. Diese Versuche umfassen die Inhibierung der Transportfunktion von MDR1/P-gp durch kompetitive Hemmung mittels Kalzium-Kanalblocker (Verapamil), Immunsuppressiva (Cyclosporin A), oder Hormone (Progesteron, Tamoxifen). Die größten Beschränkungen im Einsatz dieser MDR-Modulatoren liegen in ihrer unannehmbar hohen Zytotoxizität, bei der zur Aufhebung der MDR nötigen Konzentration und dem Phänomen, dass Tumorzellen auch gegen diese Substanzen eine sogenannte tertiäre Resistenz entwickeln können.

Deshalb ist es nötig, alternative, weniger toxische und effizientere Strategien zu erforschen, den P-Glykoprotein-abhängigen MDR-Phänotyp aufzuheben. Ein wichtiger Ansatzpunkt beruht auf der Anwendung sogenannter RNA-Technologien.

1.2.1.1.1 Inhibition von MDR1/P-gp mittels RNA-Technologie

RNA-Technologien basieren auf der Bindung komplementärer RNA an spezifische Gen-Transkripte, die infolgedessen in den Zielzellen abgebaut werden. Die Expression (Biosynthese) des Zielgens kann somit verhindert werden, ohne in das Genom der Zelle einzugreifen. Eine Methode der RNA-Technologie ist die RNA-Interferenz (RNAi), die ausführlich im Methodenteil unter 3.4 erläutert ist.

Bisherige gentherapeutische Versuche die Biosynthese von MDR1/P-gp selektiv zu blocken, beruhen auf RNA-Technologien und umfassen die Applikation von:

- Ribozymen (Holm *et al.*, 1994; Kobayashi *et al.*, 1994; Huesker *et al.*, 2002; Kowalski *et al.*, 2005),
- *antisense*-Oligonukleotiden (Liu *et al.*, 1996; Alahari *et al.*, 1998; Stuart, 2000),
- siRNAs (*small interfering* ; Nieth *et al.*, 2003; Wu *et al.*, 2003),
- shRNA (*small hairpin*) exprimierender Plasmidvektoren (Stege *et al.*, 2004 ; Yague *et al.*, 2004) oder
- shRNA exprimierender adeno-assoziiierter Virusvektoren (Xu *et al.*, 2005).

Wie bereits erwähnt, könnten diese gentherapeutischen Ansätze etablierte TumortheraPIeformen wie die Chemotherapie ergänzen. Innerhalb dieser Arbeit wird der Ansatz verfolgt, aufgrund ihrer MDR1/P-gp-Überexpression *multidrug*-resistente Tumorzellen mittels RNAi-Technologie zu resensitivieren, so dass sie durch Zytostatika wieder therapierbar werden.

Neben der Auswahl einer selektiv gentherapeutisch wirksamen Methodik wie der RNAi, ist hauptsächlich der ausreichend effiziente Transport des therapeutisch wirksamen genetischen Materials in die gewünschte Zielzelle für den Erfolg einer Gentherapie entscheidend. Nachfolgende Kapitel beschäftigen sich deshalb mit dem innerhalb dieser Arbeit und in aktuellen Gentherapiestudien am häufigsten genutzten Vektor: das Adenovirus.

1.3 Adenovirale Vektoren in der Gentherapie

Vektoren in der Gentherapie sollen eine therapeutisch wirksame Nukleinsäuresequenz in die Zellen eines Zielgewebes transportieren, um dort transkribiert zu werden. Abb. 2 gibt einen Überblick über die verwendeten gentherapeutischen Vektorsysteme, die in den seit 1989 dokumentierten 1145 klinischen Gentherapie-Studien verwendet wurden. Dabei werden derzeit 67 % der klinischen Studien zur Gentherapie im Bereich der Krebstherapie durchgeführt (Kapitel 1.1).

Da das adenovirale Genom in den Nukleus der Wirtszelle transportiert und sehr effizient translatiert wird, stellen Adenoviren einen sehr guten Kandidaten für den Transfer therapeutischer Nukleinsäuren dar (Russell, 2000). Die meisten klinisch getesteten und fortschrittlichsten mit Transgenen ausgestatteten adenoviralen Vektoren sind von der nichtreplizierenden Variante. Einige nichtreplizierende Vektoren mit Transgenen werden derzeit in Phase-II-Studien getestet. Dabei sind E1-deletierte Adenoviren wegen ihrer hohen Gentransfer-Effizienz, der Möglichkeit hohe Titer zu erzeugen und ihrer relativen Sicherheit die am häufigsten genutzten Vektoren (Vorbürger und Hunt, 2002; Oi *et al.*, 2006). Adenoviren werden in über 26 % (n = 322) der aktuellen Gentherapiestudien eingesetzt (Stand Januar 2007). 62 % der Studien befinden sich dabei in der klinischen Phase I.

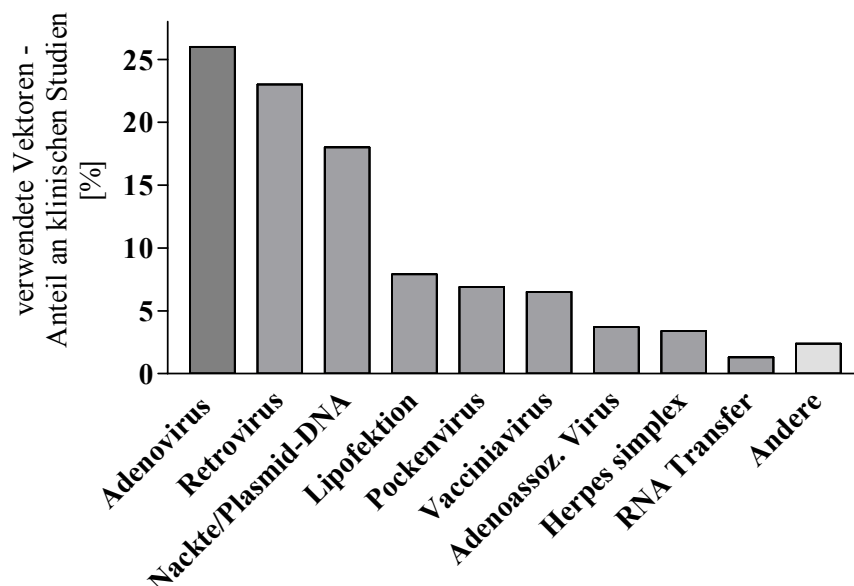


Abb. 2: Verwendete Vektoren in klinischen Gentherapiestudien

Prozentualer Anteil der in gentherapeutischen klinischen Studien verwendeten Vektorsysteme weltweit.

Quelle: <http://www.wiley.co.uk/wileychi/genmed/clinical> - Stand Januar 2007

Systemische Gentherapieansätze mit Adenoviren zeigen, dass der Hauptteil der injizierten Adenoviren nur die Kupffer-Zellen in der Leber infizieren (Worgall *et al.*, 1997). Darüber hinaus wird der auch innerhalb dieser Arbeit genutzte Adenovirus-Serotyp 5 (Ad5) über den ubiquitär exprimierten Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor (CAR) gebunden, d.h. nicht nur Tumorzellen können im systemischen Ansatz transduziert werden. Deshalb wird bisher die *in situ*-Verabreichung (siehe Kapitel 1.1) von Adenoviren bei der Gentherapie bevorzugt.

1.3.1 Bedeutung des Cocksackie-Adenovirus-Rezeptors in der Ad-Gentherapie

Das ikosaedrisch angeordnete adenovirale Kapsid trägt Proteinfibrillen an deren Enden sich C-terminal eine Knopf-Domäne befindet. Diese Domäne ist für die Bindung des Virus an seine primären zellulären Rezeptoren verantwortlich (Bergelson *et al.*, 1998; Bewley *et al.*, 1999; Roelvink *et al.*, 1999). Die Internalisierung in die Wirtszelle erfolgt über rezeptorvermittelte Endozytose (Greber *et al.*, 1993). Als maßgeblich daran beteiligt, wurde ein 46-kDa Transmembranprotein identifiziert, das sowohl als Cocksackievirus B- wie auch als Adenovirus-Rezeptor dient. Dieser Rezeptor hat entsprechend die Kurzbezeichnung CAR erhalten (Bergelson *et al.*, 1998; Tomko *et al.*, 1997).

Die CAR-Expression hat somit einen den Erfolg einer Adenovirus-Gentherapie limitierenden Charakter. Für adenovirale klinische Gentherapiestudien wird deshalb eine zeitlich vorgelagerte oder gleichzeitige Behandlung mit die CAR-Expression fördernden Substanzen wie Histon Deacetylase Inhibitoren (Sachs *et al.*, 2004) oder Trichostatin A (Bieler *et al.*, 2006) diskutiert.

1.4 Adenoviren

Die Familie der Adenoviridae gehört zu den DNA-Viren. Die Unterteilung der Adenoviridae wird in die Genera Aviadenovirus (Vogel-Adenoviren) und Mastadenovirus (Säuger-Adenoviren, Subgenera A-F) vorgenommen. Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten Adenoviren (Ad5) gehören der Subgruppe C, Serotyp 5 an und besitzen kein onkogenes Potential (Graham, 1984).

Das ikosaedrisch angeordnete Kapsid des Virions besteht aus 252 Kapsomeren und enthält das Virus-Genom in Form eines linearen, doppelsträngigen (ds) DNA-Moleküls, welches 35935 bp umfasst und mit basischen viralen Core-Proteinen assoziiert ist (Flint und Broker, 1981). Nach der Adsorption an den Cocksackie-Adenovirus-Rezeptor und der Endozytose

(1.3.1) werden die internalisierten Adenoviren aus dem Endosom in das Zytoplasma freigesetzt und entlang der Mikrotubuli zu den Kernporen transportiert (Leopold *et al.*, 2000). Im Nukleus beginnt der adenovirale Lebenszyklus.

1.4.1 Adenoviraler Lebenszyklus

Der adenovirale Lebenszyklus benötigt 32 bis 36 Stunden und ist eine regulierte Kaskade von Abläufen, die sich in frühe (*early genes*) und späte (*late genes*) Phasen unterteilen, wobei die frühe Phase mit der Expression der *early*-(E)-Gene bereits nach sechs bis neun Stunden abgeschlossen ist (Zhang, 1999). Dieser Lebenszyklus sieht keine Integration in das Wirtsgenom vor, da Adenoviren als episomale Elemente im Kern der Wirtszelle replizieren und somit keine Insertionsmutagenese verursachen, was ebenfalls dafür spricht Adenoviren als gentherapeutische Vektoren zu verwenden.

Die Gentranskripte werden über alternatives *splicing* jeder Transkriptionseinheit modifiziert, um multiple Produkte von jeder Region zu generieren (Berget *et al.*, 1977; Berk und Sharp, 1978). Viele der frühen Genprodukte (E1, E2, E3 und E4) sind kaskadenartig hintereinandergeschaltet und bedingen die Progression zur Transkription der späten Gene. Abb. 3 gibt einen Überblick über die Anordnung der frühen und späten Gene innerhalb des Adenoviralen Genoms.

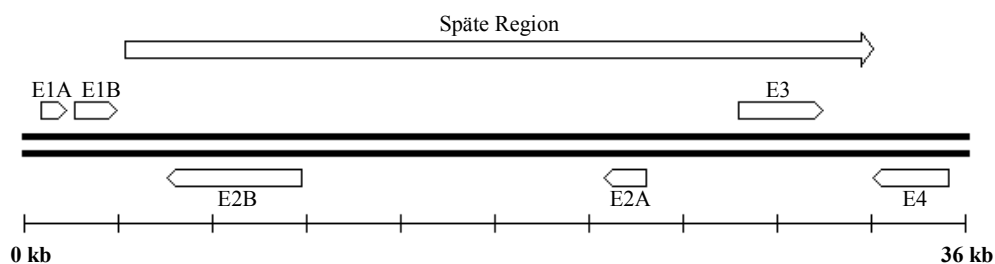


Abb. 3: Genomkarte von Wildtyp Ad5 mit den frühen Regionen (E) und der gesamten späten Region

Die doppelte, fett gekennzeichnete Linie repräsentiert die doppelsträngige Ad5-DNA. Strang und Gegenstrang enthalten kodierende Informationen. Die Gesamtlänge der Ad5-DNA (~36 kb) und die Karteneinheiten (map units) sind angegeben. Die Pfeile kennzeichnen die Transkriptionsrichtung. (Quelle: Robert Koch Institut, <http://www.rki.de/>)

Die Genprodukte der E1-Region werden im viralen Lebenszyklus am frühesten exprimiert und sind für die virusvermittelte Transformation von gesunden Zellen und für die Transaktivierung der anderen viralen Gene entscheidend (Berk *et al.*, 2005). Die E1-Region

ist in zwei Transkriptionsuntereinheiten E1a und E1b unterteilt. E1a kodiert im wesentlichen für Proteine, welche die Zelle und das Virus für den adenoviralen Lebenszyklus vorbereiten. Auf die Zelle bezogen heißt das, dass die konservierte CR2-Region des E1a Proteins das Retinoblastoma Protein (pRb) bindet, wodurch eine Zunahme an freiem E2F und damit die Deregulation des Zellzyklus gefördert wird (Ikeda und Nevins, 1993). Bezogen auf das Virus agieren die E1a Proteine als Transaktivatoren für andere adenovirale Regionen wie E1b, E3, E4 und den großen *late* Promotor (Berk *et al.*, 1979; Nevins, 1981; Sellers *et al.*, 1995).

Ein Weg, um die Expression von Regionen wie E1a oder E1b zu regulieren und damit einen sicheren, replikationsinkompetenten Ad-Vektor zu generieren, ist die Deletion der gesamten E1-Region ($\Delta E1$). Auch innerhalb dieser Arbeit sind alle Adenoviren E1-deletiert, d.h. nach Infektion der Tumorzellen wird ausschließlich die Transkription der therapeutisch wirksamen Nukleinsäuren zugelassen, ohne dass die Adenoviren unkontrolliert replizieren können.

Vom systemischen Standpunkt aus gesehen, beeinflusst die zusätzliche Deletion der gesamten oder Teilen der E3-Region die Möglichkeiten des Virus der Immunantwort des Wirts zu entgehen. *In vitro* für die virale Replikation entbehrlich, spielen E3 Proteine *in vivo* eine bedeutende Rolle (Ilan *et al.*, 1997), da sie als Modulatoren der Immunantwort fungieren und im späten Stadium des viralen Lebenszyklus bei der Lyse der Wirtszelle und der Verbreitung der Virionen mitwirken (Gooding *et al.*, 1988, 1991; Krajcsi und Wold, 1992; Hermiston *et al.*, 1993, Tollefson *et al.*, 1996; Lichtenstein *et al.*, 2004). Deshalb sollte die Deletion von Teilen oder der gesamten E3-Gene *in vivo* zu einer gesteigerten Immunantwort führen, was die Zerstörung der Tumormasse fördert.

Alle hier verwendeten Adenoviren sind zusätzlich in ihrer E3-Region deletiert: $\Delta E1/E3$.

Eine besondere Rolle im adenoviralen Replikationszyklus und innerhalb dieser Arbeit spielen die Gene der E2-Region. Die Expression der *early unit* E2 hängt von der Transaktivierung durch die E1A-Proteine ab. Die zwei Untereinheiten E2A und E2B werden in zwei große RNA-Vorläufermoleküle transkribiert, mittels alternativem *splicing* in verschiedene mRNAs modifiziert und durch zelluläre Proteinsynthesemechanismen translatiert. Damit entstehen Produkte, die für die DNA-Replikation und somit für die virale Replikation maßgeblich sind.

So steht während der frühen Phase, sechs Stunden nach Infektion, die virale Transkription unter der Kontrolle des E2A*early*-Promotors. Nach dem Beginn der DNA Replikation wird die vom E2A*early*-Promotor ausgehende Transkription reprimiert und ein zweiter starker

Promotor (E2A*late*) aktiviert (Baker und Ziff, 1981). Die E2B-Region kodiert z.B. für die virale DNA-Polymerase und das Terminale Protein (Doerfler, 1983; Fields und Knipe, 1990).

Weil viele der kritischen Funktionen von E1A und E1B in Tumorzellen komplementiert werden können, kann eine Regulation dieser Transkriptionseinheiten zu einer selektiven E2-gesteuerten viralen Replikation in Tumorzellen führen, obwohl den in dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren neben der E3-Deletion die gesamte E1-Region fehlt (Ad5 Δ E1/E3). Die selektive Replikation in Tumorzellen, welche eine replikationsinkompetente Adenovirusmutante komplementieren können, illustriert das Potential der funktionalen Überschneidungen.

Produkte der Transkriptionseinheit E4 sind für den viralen Lebenszyklus ebenso prägend. Viele Funktionen der E4 Proteine haben einen komplementären, supplementären oder inhibitorischen Charakter in Bezug auf die Proteine E1a und E1b. Zum Beispiel stimulieren E4 *orf1* und E4 *orf4* den Eintritt in die S-Phase (O'Shea *et al.*, 2005). Außerdem geht E4 *orf6* einen Komplex mit dem viralen Protein E1b-55kDa ein und reguliert so den nukleären Export von viraler und zellulärer mRNA (Dobbelstein *et al.*, 1997). Dagegen führt die Bindung von E4 *orf4* an die Phosphatase 2A zu einer Hyperphosphorylierung von ausgewählten Transkriptionsfaktoren wie der E1a Proteine, was zu einem inhibitorischen Effekt auf die E1a-induzierte Transkription von anderen viralen Transkriptionseinheiten (die E4 Region eingeschlossen) führt (Obert *et al.*, 1994). Damit wird die frühe Phase des adenoviralen Lebenszyklus' abgeschlossen.

Der starke späte (*major late*) Promotor ist auch bereits in der frühen Phase des adenoviralen Lebenszyklus aktiv. Es entstehen jedoch ausgehend von der frühen *major late*-Transkriptionseinheit (MLTU) durch frühzeitige Terminierung der Transkription in dieser Phase nur kurze mRNA-Moleküle. Zu einem späteren Zeitpunkt der Infektion wird diese Blockade aufgehoben und die späte MLTU produziert große Mengen an langen RNA-Molekülen, die fast ausschließlich in Strukturproteine translatiert werden, die für den Zusammenbau des Virions nötig sind.

Adenoviren werden bereits im Zellkern zusammengebaut. Dabei entstehen 10^4 - 10^5 Viren pro Zelle. Während dieses Prozesses blockieren virale Faktoren (E1B und E4) einerseits die Synthese zellulärer Proteine durch Repression des RNA-Transports vom Zellkern ins Zytoplasma als auch durch Translationshemmung. Andererseits verhindern sie, dass zelluläre

Faktoren die Virusproduktion unterdrücken. Infolge dessen ist die Zelle schon zu Beginn der Expression der frühen adenoviralen Gene unterversorgt (sofern diese wie in dieser Arbeit nicht deletiert sind). Sie stirbt somit innerhalb von 30-40 Stunden nach der Infektion (zytopathischer Effekt, siehe 3.5.6) und setzt dann die neusynthetisierten Virionen frei.

Nach der Beschreibung des adenoviralen Reproduktionszyklus kann zusammenfassend festgestellt werden, dass infektiöse, aber wegen ihrer E1-Deletion ($\Delta E1$) nicht replizierende Adenovirusvektoren, aufgrund ihres geringen Gefährdungspotentials, ihrer Stabilität, der Möglichkeit hohe Titer zu erzeugen und ihrer leichten Handhabung in der Gewebekultur, sehr gut für den Transfer von therapeutisch wirksamen Nukleinsäuren in der Gentherapie geeignet sind.

Werden wie innerhalb dieser Arbeit aber humane Tumorzelllinien mit $\Delta E1$ -Adenoviren transduziert, muss beachtet werden, dass viele der kritischen Funktionen der frühen Transkripte (E1) wie Deregulation des Zellzyklus und Inhibition der Apoptose durch den wegen der Tumorzelldifferenzierung deregulierten Zellstatus, komplementiert werden könnten (Yew und Berk, 1992; Lukas *et al.*, 1994; Han *et al.*, 1998). Dadurch kann eine Replikation von replikationsinkompetenten Adenoviren ermöglicht werden.

Aufbauend auf Untersuchungen der auch innerhalb dieser Arbeit verwendeten *multidrug*-resistenten Tumorzellen konnte ein neuartiges replikationskompetentes Adenovirus entwickelt werden (Holm *et al.*, 2002). Dieser durch eine E1-Deletion ($\Delta E1$) eigentlich replikationsinkompetente Vektor enthält den humanen Transkriptionsfaktor YB-1 als Transgen und wurde als AdYB-1 bezeichnet. Untersuchungen zeigten, dass AdYB-1 durch diese Veränderung replizieren und Tumorzellen lysieren konnte, d.h. die Insertion von YB-1 als Transgen ermöglichte eine E1-unabhängige Replikation dieses Virus.

Dies führte zur eingehenden Untersuchung der YB-1 Expression in den innerhalb dieser Arbeit verwendeten Tumorzelllinien und der Fragestellung in wie fern der zelluläre YB-1-Status *multidrug*-resistenter Tumorzellen im Vergleich zu deren *multidrug*-sensitiven, parental Varianten Auswirkungen auf eigentlich nicht replizierende ($\Delta E1$) Adenoviren hat. Das folgende Kapitel geht deshalb auf die YB-1 Lokalisation in Tumorzellen und dessen Funktionalität ein.

1.5 Der Faktor YB-1

Das multifunktionale regulatorische Y-Box-Protein 1 (YB1/dbpB/p50) kann an Einzelstrang, als auch Doppelstrang-DNA binden und wurde erstmals als ein Transkriptionsfaktor beschrieben, der mit der Y-Box des *Major Histocompatibility Complex Class II* (MHC II) Promotor interagiert (Didier *et al.*, 1988).

Auch Goldsmith *et al.* (1993) sowie Ohga *et al.* (1996) identifizierten dieses DNA-bindende Protein, welches die Y-Box im MDR1 Promotor erkennt.

YB-1 bindet spezifisch an doppelsträngige DNA mit der Sequenz CTGATTGG (C/T)(C/T)AA, die als Y-Box bekannt ist (Didier *et al.*, 1988). Diese Sequenz enthält eine reverse CCAAT-Box (oben unterstrichen), die man in Transkriptions-Kontroll-Regionen nicht nur im *MDR1*-Gen, sondern in einer Reihe von eukaryotischen Genen wie zum Beispiel EGF-Rezeptor, DNA Polymerase α , Thymidin-kinase, *Myelin basic protein*, Topoisomerase II α und dem apoptoseassoziierten Zelloberflächenrezeptor *Fas* finden kann (Sakura *et al.*, 1988; Wolffe *et al.*, 1992; Haas *et al.*, 1995; Lodomery und Sommerville, 1995; Lasham *et al.*, 2000). Bei diesen Genen ist YB-1 sehr wahrscheinlich ein Regulator auf Transkriptionsebene. In diesem Zusammenhang besonders hervorzuheben ist, dass sich im adenoviralen Genom innerhalb des E2A/late-Gens drei solcher Y-Boxen befinden (Goding *et al.*, 1987).

1.5.1 Lokalisation von YB-1

Das humane *YB-1* Gen ist auf Chromosom 1p34 lokalisiert, besteht aus 8 Exons und umfasst 19 kb genomische DNA (Toh *et al.*, 1998). Die mRNA hat eine Größe von ca. 1,5 kb und kodiert für ein 43 kDa Protein (Kohno *et al.*, 2003).

Das Protein YB-1 befindet sich im wesentlichen im Zytoplasma, assoziiert mit einem Ankerprotein. Die Bindungsstelle für das Ankerprotein befindet sich laut Koike *et al.* (1997) an der C-terminalen Schwanzdomäne. YB-1 besitzt aber die Fähigkeit sich während des Übergangs der Zellen von der G1- in die S-Phase in den Zellkern zu lokalisieren, um die Gentranskription zu regulieren. Im Kern assoziiert es mit den Transkripten und dirigiert diese in das Zytoplasma (Soop *et al.*, 2003).

YB-1 wird in Tumorzellen generell überexprimiert (Kohno *et al.*, 2003). Die Behandlung von humanen Tumorzellen mit UV-Bestrahlung, Hyperthermie oder Zytostatika resultiert in einer permanenten Akkumulation von YB-1 im Nukleus (Koike *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2001; Yahata *et al.*, 2002). Eine gesteigerte nukleäre und/oder zytoplasmatische Expression von YB-1 konnte in einer Reihe von Tumoren einschließlich Brust-, Schilddrüsen-, Ovarial-,

Gebärmutterhals- und kolorektalen Neoplasien sowie im Osteo- und Synovialsarkom wiederholt detektiert werden (Bargou *et al.*, 1997; Montani *et al.*, 1998; Kamura *et al.*, 1999; Lasham *et al.*, 2000; Shibao *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 1998 und 2003). Die nukleäre YB-1 Expression korreliert signifikant mit Tumorgröße, Grad der Invasion, Zahl der Lymphknotenmetastasen und schlechter Prognose in Lungentumoren und Synovialsarkom (Shibahara *et al.*, 2001). Janz *et al.* (2002) zeigten, dass die Detektion von YB-1 prognostische und prädiktive Signifikanzen in Brustkrebs anzeigen kann.

1.5.2 Funktion von YB-1

YB-1 bindet die Y-Box mit einem 78 Aminosäuren umfassenden Motiv nahe seines N-Terminus, welches bei allen Mitgliedern der Familie der Y-Box Proteine hoch konserviert ist (Kohno *et al.*, 2003). Die Tatsache, dass YB-1 zu einer evolutionär stark konservierten nukleinsäurebindenden Proteinfamilie gehört (La Teana *et al.*, 1991) und die große Anzahl von Genen, die Y-Box Elemente in ihren Promotoren enthalten, suggeriert, dass YB-1 essentielle biologische Prozesse regulieren kann (Kuwano *et al.*, 2003).

YB-1 wird besonders während der Zellentwicklung sowie in proliferierenden Zellen in hohen Dosen exprimiert (Grant und Deeley, 1993). Viele vor allem den Zellzyklus regulierende Gene enthalten Y-box Elemente, was zu der Annahme führt, dass YB-1 auch eine kritische Rolle innerhalb der Zellzykluskontrolle spielt (Ladomery und Sommerville, 1995). Zum Beispiel werden die Zellzyklus-Progressionsgene Cyclin A und B1 von YB-1 aufreguliert (Jürchott *et al.*, 2003).

YB-1 wird ebenfalls als starker Regulator des Gens *MDR1* angesehen (Bargou *et al.*, 1997; Ohga *et al.*, 1998). Dafür spricht unter anderem, dass ein minimales Promotorfragment von *MDR1*, dass die Y-Box und eine GC-Box enthält, ausreichend ist, um in Transfektionsexperimenten die volle Promotoraktivität zu erreichen (Goldsmith *et al.*, 1993). Außerdem schützt YB-1 bestimmte Zellen vor Apoptose. Wird es beispielsweise in B-Lymphozyten überexprimiert, wirkt es als transkriptionaler Repressor von *Fas* (Lasham *et al.*, 2000, siehe auch 1.5). Dagegen führt die Inaktivierung von YB-1 in pre-B-Lymphozyten zu einer erhöhten Apoptoserate (Swamynathan *et al.*, 2002). Beide Forschungsergebnisse zeigen, dass YB-1 eine zentrale Rolle beim Zelltod spielt.

Als ein Hauptbestandteil von zytoplasmatischen Ribonukleoprotein (RNP)-Partikeln kontrolliert YB-1 ebenfalls die Proteintranslation (Evdokimova *et al.*, 1998; Sommerville 1999). Es bindet beispielsweise an die 5'-cap Struktur der Interleukin-2 (IL-2) mRNA, stabilisiert diese und ermöglicht damit eine höhere IL-2 Translation (Chen *et al.*, 2000). In

gleicher Weise erweitert YB-1 die Translation von mRNAs, die *Iron Response Elements* (IREs) enthalten, in dem es das inhibitorische IRE-Bindungsprotein-2 (IRP2) von diesen Elementen disloziert (Ashizuka *et al.*, 2002). Darüber hinaus weist YB-1 eine Exonukleaseaktivität auf, was ein Mitwirken in DNA-Reparaturmechanismen impliziert (Izumi *et al.*, 2001). Selbst wird YB-1 beispielsweise durch ein F-Box-Protein über Ubiquitinierung und Überführung in das Proteasom reguliert (Lutz *et al.*, 2006).

Zudem konnte von Chansky *et al.* (2001) gezeigt werden, dass YB-1 mit dem *Translocation Liposarcoma Protein* (TLP) direkt interagiert, welches als Adaptermolekül zwischen Gentranskription und RNA *splicing* dient. Während dieser Interaktion wird YB-1 zur RNA Polymerase II rekrutiert und begünstigt das *splicing* der adenoviralen E1A pre-mRNA. Holm *et al.* (2004) konnten außerdem nachweisen, dass YB-1 eine effiziente Replikation von E1A-deletierten adenoviralen Vektoren in *multidrug*-resistenten Tumorzellen ermöglicht.

Der Promotor des adenoviralen Gens E2*Alate* enthält drei invertierte CCAAT-Boxen (Goding *et al.*, 1987) und damit Bindungsstellen für YB-1. Die Adenovirusreplikation findet im Zellkern statt und hängt maßgeblich von den viralen Proteinen ab, die innerhalb der E2-Gene kodiert werden (Swamynathan und Thimmapaya, 1995). In mit Adenoviren transduzierten Zellen wird der E2*early* Promotor normalerweise durch die adenoviralen Proteine E1A und E4-6/7 transaktiviert (Swamynathan und Thimmapaya, 1996). Spezifische Interaktionen von YB-1 mit viralen Transkriptionsfaktoren konnten bereits gezeigt werden, zum Beispiel beim humanen T-Zell Lymphtropischen Virus Typ I (HTLV-I) über das *Downstream Regulatory Element 1* (Kashanchi *et al.*, 1994) oder auch beim humanen neurotrophen JC-Polyoma-Virus: hier steigert YB-1 die Transkription, indem es die Affinität von p65 für die NF-kappa-B-Region, einen Bestandteil der Transkriptions-Kontroll-Region des Virus, erhöht (Raj *et al.*, 1996). Beim humanen Papillomavirus (HPV) Typ 18 wurden ebenfalls Interaktionen zwischen YB-1 und der *Enhancer*-Region beobachtet (Spitkovskii *et al.*, 1993), aber auch beim innerhalb dieser Arbeit verwendeten Adenovirus Subtyp 5 spielt YB-1 als Transaktivator des E2*late* Promotors eine maßgebliche Rolle (Holm *et al.*, 2002).

Die bisher beschriebenen zellulären Funktionen des Proteins YB-1, dessen Interaktionen mit anderen zellulären und auch viralen Proteinen und mRNAs sowie die Stimuli, die dessen Translokation verursachen, sind in Abb. 4 zusammengefasst.

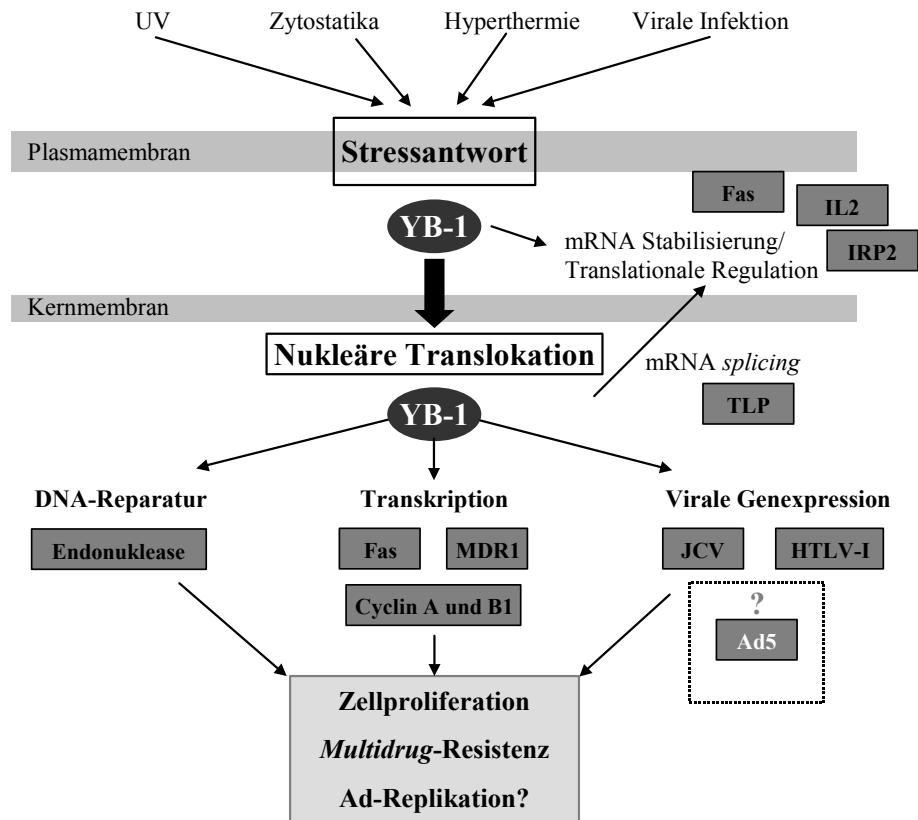


Abb. 4: Lokalisation und zelluläre Funktionen von YB-1 (modifiziert nach Kohno *et al.*, 2003)

YB-1 ist im wesentlichen im Zytoplasma lokalisiert. Es interagiert dort mit verschiedenen zytoplasmatischen Proteinen und mRNAs. Chemotherapie, UV-Bestrahlung und andere Stimuli können eine nukleäre Translokation von YB-1 initiieren. Dort ist es bei der Steuerung fundamentaler zellulärer bzw. viraler Prozesse beteiligt.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass YB-1 ein multifunktionales Protein ist, dessen Expression eine Reihe bedeutender zellulärer und auch viraler Gentranskriptions- und Translationsaktivitäten *in vitro* bedingt. In Bezug auf dessen Expression in *multidrug*-resistenten Tumorzellen könnte es eine bedeutende Rolle spielen, werden diese aus gentherapeutischen Gründen adenoviral transduziert. Die Integration von YB-1 als Transgen in ein eigentlich nicht replizierendes ($\Delta E1$) Adenovirus (Holm *et al.*, 2002) und die dadurch verursachte Restauration der Replikationskompetenz, deutet darauf hin, dass YB-1 als Transgen die Funktionalität des E1-Proteins übernehmen kann und somit die adenovirale Replikationskaskade anstößt.

Ob die intrinsische zelluläre Expression von YB-1 in *multidrug*-resistenten Tumorzellen einen vergleichbaren Effekt auslöst und damit im Hinblick auf eine adenovirale Gentherapie von Bedeutung ist, wurde hingegen bisher nicht ausreichend geklärt und ist unter anderem ein wichtiger Gegenstand dieser Arbeit.

1.6 ZIEL DER ARBEIT

Radikale chirurgische Therapie sowie die Kombinationstherapie mit Zytostatika haben die Prognose betroffener Tumorpatienten nicht in dem erhofften Maße verbessern können. Zudem treten MDR1/P-gp vermittelte Zytostatikaresistenzen auf. Die schlechten Heilungsaussichten für die Mehrheit der Patienten haben u.a. zur Evaluation der Gentherapie als Additiv zu den etablierten Therapien geführt.

In früheren Studien konnte die MDR1/P-gp vermittelte *Multidrug*-Resistenz durch RNA-Technologie erfolgreich inhibiert werden (Lage, 2006). Für den Erfolg einer Gentherapie ist vorrangig, dass das genetische Material ausreichend effizient in die gewünschte Zielzelle transferiert und dort exprimiert werden kann. Aktuelle Gentherapiestudien bevorzugen das Adenovirus als effizienten Vektor (Stand 2007).

Deshalb wurde innerhalb der vorliegenden Arbeit die Interaktion zwischen adenoviral-vermittelter anti-MDR1 RNAi-Gentherapie und Chemotherapie in humanen *multidrug*-resistenten Magenkarzinom- (EPG85-257RDB), Pankreaskarzinom- (EPP85-181RDB) und Zervixkarzinomzelllinien (HeLaRDB) am Beispiel der Zytostatika Daunorubicin, Vincristin und Cisplatin untersucht. Dazu wurden adenovirale Vektoren entwickelt, die über den RNA-Interferenz-Mechanismus den für die klassischen MDR-Phänotyp verantwortlichen ABC-Transporter MDR1/P-gp spezifisch inhibieren.

Da die untersuchten *multidrug*-resistenten Tumorzellen eine permanente nukleäre Akkumulation des multifunktionalen regulatorischen Y-Box-Proteins 1 (YB-1) aufweisen und innerhalb dieser Arbeit nachgewiesen wurde, dass YB-1 in *multidrug*-resistenten Tumorzellen die Replikation von eigentlich replikationsinkompetenten ($\Delta E1$) Adenoviren unterstützt, konnte erstmals der Zusammenhang zwischen dem YB-1 Status, der adenoviralen Replikation und der gentherapeutischen Effizienz adenoviral vermittelter RNA-Interferenz untersucht werden, um Implikationen für die adenovirale RNAi-Gentherapie *multidrug*-resistenter Tumoren abzuleiten.

2 MATERIAL

2.1 Chemikalien

Alle Chemikalien wurden mit dem Reinheitsgrad *pro analysi* erworben.

Chemikalie	Hersteller
Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	Qbiogene
Agarose Ultra Pure	Invitrogen
Amidoschwarz (naphthol blue black)	Sigma-Aldrich
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	Merck
Amphotericin B	Biochrom
Antibody Diluent, Background Reducing	DakoCytomation
Bacto Agar	Difco Laboratories
Bacto Hefeextrakt	Difco Laboratories
Bacto Trypton	Difco Laboratories
Beta-Mercaptoethanol	Promega
Blasticidin S HCl	Invitrogen
Blue/Orange 6 x Loading Dye	Promega
Borsäure	Merck
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenol blau	Merck
Carbenicillin	Sigma-Aldrich
Cäsium Chlorid, <i>Grade II</i>	Sigma-Aldrich
Cisplatin	GRY-Pharma
Color Markers (high range, 29-205 kDa)	Sigma-Aldrich
<i>Complete</i> (Proteinase-Inhibitor)	Roche Diagnostics
Daunorubicin Hydrochlorid (Daunoblastin)	Farmitalia Carlo Erba
Denhardt's Reagenz	Fluka
2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat	Roche Diagnostics
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
DL-Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich
DMEM (Dulbecco's modified Eagle medium)	Cambrex
Donor Horse Serum	Biochrom
Doxycyclin	Clontech
Entwickler RP X-OAT EX	Eastman Kodak
Essigsäure	J.T. Baker
Ethanol absolut	J.T. Baker
Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml)	Sigma-Aldrich
Ethylendiamintetraessigsäure-di-Natriumsalz (EDTA)	SERVA Electrophoresis
Ethylenglycol-bis(2-aminoethylether)-N,N,N',N'-tetraessigsäure (EGTA)	Merck

ExpressHyb Hybridization Solution	BD Biosciences
Fetuin	Sigma-Aldrich
Fixierer RP X-OMAT LO	Eastman Kodak
Fötales Kälberserum (FCS)	Biochrom
Formaldehyd (37 %)	J.T. Baker
Formamid	Merck
GeneRuler 100 bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Geneticinsulfat-418 (G-418)	Sigma-Aldrich
D(+)-Glukose-Lösung (45 %)	Sigma-Aldrich
L-Glutamin (200 mM)	Cambrex Bio Science
Glyzerin (pflanzlich)	SERVA Electrophoresis
Harnstoff	Merck
H-Insulin (40 IE/ml), Insuman Rapid	Aventis Pharma
Hydroxyurea (Hydroxycarbamid)	Sigma-Aldrich
Kaliumhydroxid	Merck
Kanamycinsulfat	Sigma-Aldrich
Leibovitz L-15 Medium ohne L-Glutamin	BioWhittaker
Low melting point agarose SeaKem ME	Cambrex
Mayer's Hematoxylin	DakoCytomation
MEM (1x und 10x)	Invitrogen
MEM-Vitamine (100 ×)	Biochrom
Methanol	J.T. Baker
Molekularbiologisches Wasser	Eppendorf
3-(n-Morpholino)-Propansulfonsäure (MOPS)	Merck
Natriumazetat	Merck
Natriumbikarbonat 7,5 % (w/v)	Biochrom
Natriumchlorid	Merck
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Merck
Natriumhydrogenkarbonat	Merck
NovaRed	Vector Laboratories
Opti-MEM mit GlutaMax I	Invitrogen
Penicillin/Streptomycin (100.000 U/ml / 10 µg/ml)	Biochrom
Phenol:Chlorophorm:Isoamyl Alkohol (25:24:1, v/v)	Gibco BRL
Primary Mouse Negative Control	DakoCytomation
2-Propanol	J.T. Baker
RNA Ladepuffer (NorthernMax Formaldehyde Load Dye)	Ambion
RNA-Längenstandard 0,24-9,5 kb	Life Technologies
SOC-Medium (super optimal catabolic)	Invitrogen
Sulforhodamin B (SRB)	Sigma-Aldrich
TEMED (N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin)	Sigma-Aldrich

Transferrin	Roche Diagnostics
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck
Trichloressigsäure (TCA)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Tris-Base)	Merck
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan-hydrochlorid (Tris-HCl)	Merck
Triton X-100	Sigma-Aldrich
Trypsin-EDTA-Lösung 0,5 % / 0,2 % (w/v) in PBS (10x)	Biochrom
Tween 20	SERVA Electrophoresis
Vincristinsulfat	GRY-Pharma
Zeocin	Invitrogen

2.2 Antikörper

Antikörper	Hersteller
Anti-YB-1	H.D. Royer (Center of Advanced European Studies and Research, Bonn)
<i>Goat anti-Mouse IgG</i> , (H+L), Peroxidase konjugiert	Perbio Science
Mouse monoclonal anti-Actin	Chemicon International
<i>Mouse monoclonal</i> anti- β -Galactosidase	Invitrogen
<i>Mouse monoklonal</i> anti-P-glycoprotein (C219)	Alexis Biochemicals

2.3 Enzyme

Enzym	Hersteller
Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIP)	New England Biolabs
AmpliTaqGold (5 U/ μ l)	Perkin Elmer
AseI	New England Biolabs
BamHI	New England Biolabs
EcoRI	New England Biolabs
EcoRV	New England Biolabs
HindIII	New England Biolabs
KpnI	Fermentas
LR Clonase Enzyme Mix	Invitrogen
PacI	New England Biolabs
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
T4 Polynukleotidkinase	Invitrogen
RNase, DNase-frei (500 μ g/ml)	Roche Diagnostics
SuperFect Transfection Reagent	Qiagen
XbaI	New England Biolabs
XhoI	New England Biolabs

2.4 Kits

Kit	Hersteller
Adeno-X Rapid Titer Kit	BD Biosciences
CalPhos Mammalian Transfection Kit	Clontech
Decade Marker System	Ambion
ECL Western Blotting Analysis System	Amersham Biosciences Europe
EndoFree Plasmid Maxi Kit	Qiagen
LightCycler FastStart DNA Master SYBR Green I	Roche Diagnostics
Megaprime DNA Labelling System	Amersham Biosciences
<i>mir</i> Vana miRNA Isolation Kit	Ambion
Qiaprep miniprep	Qiagen
Qiaprep midiprep	Qiagen
Qiaprep maxiprep	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
Quick Ligation Kit	New England Biolabs
RNeasy mini Kit	Qiagen GmbH
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Perbio Science
SuperScript First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Invitrogen
TOPO TA Cloning Kit (mit pCR2.1)	Invitrogen
<i>TOPO TA Cloning Kit</i> (mit pCDNA3.1/V5-His-TOPO)	Invitrogen
Western Blot Recycling Kit	Alpha Diagnostic
Wizard SV Genomic DNA Purification System	Promega

2.5 Radionukleotide

Radionukleotid	Hersteller
$\alpha^{32}\text{P}$ dCTP 10 mCi/ml (3000 Ci/mmol)	Amersham Biosciences
$\gamma^{32}\text{P}$ dATP 50 μCi (je Tip)	Amersham Biosciences

2.6 Verbrauchsmaterialien

Die verwendeten Verbrauchsmaterialien wie serologische Pipetten, Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße wurden von der Firma Eppendorf bezogen. Von der Firma Falcon wurden die Materialien für die Zellkultur wie Kulturgefäße und Probenröhrchen verwendet. Glasgefäße wurden von der Firma Schott bezogen.

Verbrauchsmaterial	Hersteller
Chromatographiepapier 3MM CHR	Whatman
Chamber Slide System (LAB-TEK II)	Nalge Nunc International
Dialyse Kassetten (<i>Slide-A-Lyzer</i> 10,000 MWCO)	Perbio Science

Einfrierröhrchen Cellstar Cryos
 Einmal-Küvetten Plastibran
 Handschuhe SafeSkin SatinPlus
 Hyperfilm ECL
 Kodak BioMax MR Film
 Klonierungszylinder
 Light Cycler Capillaries (20 µl)
 Nylontransfermembran Hybond-N⁺
 Protran BA 85 Zellulosenitrat
 Ultra Clear Centrifuge Tubes

Greiner Bio-One
 Brand GmbH + Co KG
 Kimberley-Clark
 Amersham Biosciences
 Eastman Kodak
 Fisher Scientific
 Roche Diagnostics
 Amersham Biosciences
 Schleicher & Schuell
 Beckman

2.7 Geräte

Gerät	Hersteller
BioKineticsReader EL 340 (ELISA)	Bio-Tec Instruments
Brutschrank Hera cell 240	Heraeus Instruments
Brutschrank für Bakterienkultur	Heraeus Instruments
Digital Printer UP-D860E/ Gel Print 2000i	Sony
DNA Thermal Cycler 480	Perkin Elmer
Durchflusszytometer (FACS)	Becton Dickinson
Durchlicht-Mikroskop LSM II	Zeiss
Expositionskassette (Hypercassette)	Amersham Biosciences
Gelelektrophoresekammer -mini Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Gelelektrophoresekammer -wide mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories
Gelelektrophoresekammer -mini Protean II	Bio-Rad Laboratories
<i>GeneZapper</i> 450/2500 (Elektroporator)	IBI
Hybridisierungsöfen OV1	Biometra
Inverses Forschungsmikroskop IMT-2	Olympus
Inverses Forschungsmikroskop DMIL	Leica
Inverses Forschungsmikroskop Axiovert CFL	Zeiss
Laborwaage BL1500S	Sartorius AG
LightCycler Instrument	Roche Diagnostics
Magnetrührer RCT Basic	IKA-Labortechnik
MP 220 pH-Meter	Mettler Toledo
Multikanalpipette	Eppendorf
Nalgene Cryos 1 °C Freezing Container	Nalgene Europe
Pipetboy acu	Integra Bioscience
Photometer GeneQuant II	Amersham Biosciences
Reinstwasseranlage Milli-RO 10/Milli-Q Plus	Millipore
SmartSpec Plus Spectrophotometer	Bio-Rad Laboratories
Steri-Cult 200 Inkubator	Forma Scientific

Stromversorgungsgerät Power Pac 200

Thermomixer 5436

Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell

Trio Thermoblock

Schüttelinkubator WT16

Steril-Bank Lamin Air HBB 2472

UV *Crosslinker* UVC1000

UV-Transilluminator

Varioklav 75S

Vortex VF 2

Wasserbad 1002

Zentrifugen:

- GS-6KR

- Kühlzentrifuge J2-MC (Rotor: JA25.5 und JA 14)

- Optima LE80K Ultrazentrifuge

- Tischzentrifuge 5415 C

Zellzählkammer Fuchs-Rosenthal

Bio-Rad Laboratories

Eppendorf-Netheler-Hinz

Bio-Rad Laboratories

Biometra

Biometra

Heraeus Instruments

Hofer

MWG-Biotech

H+P Labortechnik

IKA-Labortechnik

GFL

Beckman Coulter

Beckman Coulter

Beckman Coulter

Eppendorf

HBG

2.8 Software

Software	Hersteller
Adobe Photoshop 7.0.1	Adobe Systems
BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov
Chromas Lite 2.01	http://www.technelysium.com.au
GraphPad Prism 3.02	GraphPad Software
KinetiCale version 2.12 (ELISA-Reader)	Bio Tek
LightCycler Software 3.0	Roche Diagnostics
Microsoft Office 2000	Microsoft
Mfold	http://bioinfo.math.rpi.edu

3 METHODEN

3.1 Zellen und Zellkultur

3.1.1 Kultivierung von humanen Zelllinien

Die in dieser Arbeit verwendete humane Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P (Dietel *et al.*, 1990) und Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181P (Lage *et al.*, 2002) sowie deren klassisch *multidrug*-resistenten Subzelllinien EPG85-257RDB und EPP85-181RDB wurden vom Institut für Pathologie der Charité-Universitätsmedizin Berlin bereitgestellt.

HeLa-Zellen leiten sich von einem menschlichen Zervixkarzinom ab und werden seit 1951 in permanenter Kultur gehalten (Gey *et al.*, 1952).

Die gastrointestinalen Tumorzelllinien, als auch die Zervixkarzinomzelllinie HeLa wurden mit Leibovitz L15 Medium, supplementiert durch 10 % fötales Kälberserum (FCS), 1 mM L-Glutamin, 6,25 mg/ml Fetuin, 1 % essentielle Vitamine, 80 IE/l Insulin, 1,1 g/l NaHCO₃, 1 g/l Glukose und 20000 kIE/l Trasylol in einer Atmosphäre von 5 % CO₂ und 37 °C kultiviert.

Zur Aufrechterhaltung des klassischen MDR-Phänotyps wurde den MDR1/P-gp überexprimierenden Zelllinien EPG85-257RDB und EPP85-181RDB 4.31 µM (2,5 µg/ml) Daunorubicin zugesetzt. Durch Zugabe von 0,25 µg/ml Daunorubicin konnte die MDR1/P-gp überexprimierende Zervixkarzinomzelllinie HeLaRDB selektiert werden.

Die adhärent wachsende embryonale Nierentubuluszelllinie HEK-293A (*human embryonal kidney*) exprimiert die E1-Genprodukte (E1a und E1b) des humanen Adenovirus Typ 5 *in trans* (Graham *et al.*, 1977). Das E1-Gen (Nukleotide 1-4344 von Ad5) befindet sich innerhalb der HEK-293A auf Chromosom 19q13.20 (Louis *et al.*, 1997). Wird adenovirale E1-deletierte DNA in diese Zelllinie transfiziert, repliziert das adenovirale Genom und Adenoviruspartikel werden gebildet, jedoch sind diese infektiösen Adenoviren wiederum E1-deletiert (Δ E1) und damit replikationsinkompetent. HEK-293A Zellen wurden in Dulbecco's DMEM Medium mit 10 % FCS, 2,5 mg/ml Amphotericin B und 4 mM L-Glutamin kultiviert.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von humanen Zelllinien

Die Zellen wurden bei etwa 80 % Konfluenz trypsinisiert und pelletiert. Die Resuspension von 10^6 Zellen erfolgte in 1 ml FCS mit 5 % DMSO. Diese wurden in Einfriereröhrchen in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox langsam auf -80 °C abgekühlt. Die dauerhafte Lagerung erfolgte bei -80 °C oder bei -196 °C in flüssigem Stickstoff.

Zum Auftauen der Zellen wurde die Zellsuspension in kurzer Zeit auf 37 °C erwärmt und in ein Kulturgefäß mit dem entsprechenden Medium überführt. Nach spätestens 24 h erfolgte ein Mediumwechsel.

3.1.3 Transfektion von humanen Zelllinien

3.1.3.1 Transfektion von HEK-293A

Die Transfektion von 20 % konfluenten HEK-293A mit E1/E3-deletierten adenoviralen Vektoren erfolgte mittels Kalziumphosphat-Methode. Dafür wurden 1-2 µg linearisierte adenovirale DNA in 100 µl 20 mM Kalziumchlorid unter vortexen in 100 µl HBS (HEPES buffered saline: 20 mM HEPES, 140 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,75 mM Na_2HPO_4 , 7,6 mM Glukose, pH 7,0) eingetropft.

Durch das Mischen der DNA-KCl- und der phosphatgepufferten HBS-Lösung fällt Kalziumphosphat als Präzipitat aus. Die DNA, die auch Phosphatgruppen enthält, fällt bei dieser Methode ebenfalls aus und wird mit dem Kalziumphosphat über Endozytose in die Zellen aufgenommen (Graham und van der Eb, 1973).

Nach 20 min Inkubation bei Raumtemperatur wurden die Transfektionsansätze auf die ausgelegten HEK-293A gegeben und 4 h im Brutschrank (37°C, 5 % CO_2) inkubiert.

Im Anschluss an die Inkubation wurden die transfizierten HEK-293A mit PBS gespült und in DMEM (mit 10 % FCS) solange inkubiert, bis sie nach durchschnittlich 10 Tagen aufgrund ihrer Adenovirusproduktion einen zytopathischen Effekt (*cytopathic effect*, CPE, siehe 3.5.6) zeigten.

3.1.3.2 Stabile Transfektion von humanen Tumorzelllinien

Für die stabile Integration von anti-YB-1 shRNA Expressionskassetten in das Genom der humanen Magenkarzinomzelllinien EPG85-257P und EPG85-257RDB, wurden diese in 10 cm Kulturschalen subkonfluent mit den entsprechenden Expressionsvektoren transfiziert. Dafür wurden 5 µg Plasmid-DNA mit serumfreiem Medium (Opti-MEM) auf 225 µl aufgefüllt und vermischt. Nach der Zugabe von 30 µl *Superfect* und einem 10 min

Inkubationsschritt (RT) bildeten sich DNA-*Superfect*-Komplexe. Diesen wurde 1,5 ml L-15-Medium (mit FCS) beigefügt und die Mischung für drei Stunden bei 37 °C auf die Zellen gegeben. Nach einem Waschschrift mit PBS und Mediumwechsel wurden die Zellen über Nacht kultiviert. Einen Tag nach der Transfektion wurden unbehandelte und die transfizierten Zellen einem Selektionsmedium (L-15 mit 10 µg/ml Blasticidin und 400 µg/ml Zeocin) ausgesetzt. Nachdem die nicht-transfizierten Ausgangszellen durch die selektive Behandlung vollständig abgestorben waren, wurden herangewachsene Zellklone mittels sterilen Klonierungszyklindern voneinander isoliert, trypsiniert und in entsprechendem Selektionsmedium einzeln weiterkultiviert.

3.1.4 In vitro Zytotoxizitätsassay mittels Sulphorhodamin B

Die Bestimmung der Überlebensrate der sensitiven, resistenten und resensitvierten Tumorzellen wurde mit dem Sulphorhodamin B (SRB)-Test durchgeführt. Der SRB-Test ist eine empfindliche Methode zur Bestimmung des Proteingehalts einer Zelle. Dieser ist über einen großen Bereich linear zur Zellzahl (Skehan *et al.*, 1990).

Zunächst wurden die zu untersuchenden Zellen in 12- oder 96-well Mikrotiterplatten ausgesät. Diese wurden nach 24 h einer entsprechenden Zytostatika-Verdünnungsreihe ausgesetzt und für weitere 5 Tage kultiviert. Danach wurde das Medium verworfen und die Zellen in 10 %iger Trichloressigsäure für 1 h bei 4 °C fixiert, fünfmal mit Wasser gewaschen und die zellulären Proteine für 10 min mit SRB-Lösung (0,4 % Sulphorhodamin B in 1 % Essigsäure) gefärbt. Die überschüssige Färbelösung wurde durch fünfmaliges Waschen mit 1 %iger Essigsäure entfernt und die Mikrotiterplatten bei RT getrocknet. Die Protein-SRB-Komplexe wurden dann mit 10 mM Tris-HCl (pH 8,0) eluiert. Die photometrische Messung der Färbeintensität erfolgte im Plattenlesegerät EL-340 bei 562 nm gegen 690 nm (Referenzwellenlänge).

3.1.5 Durchflusszytometrie

Für die Messung der intrazellulären Akkumulation von Daunorubicin wurden gegenüber Daunorubicin sensitive, resistente und mittels adenoviral vermittelter RNAi gegen MDR1/P-gp resensitivierte Tumorzellen 1 h bei 37 °C / 5 % CO₂ mit 10 µM Daunorubicin inkubiert, mit PBS gewaschen, trypsiniert, 5 min mit 800 rpm zentrifugiert, in 500 µl eiskaltem PBS resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert.

Daunorubicin verhält sich wie ein fluoreszierender Farbstoff, diffundiert passiv durch die Zellmembran und wird von MDR1/P-gp-überexprimierenden Karzinomzellen aktiv ausgepumpt. Das Absorptionsmaximum $\lambda_{\text{ex}} = 480 \text{ nm}$ liegt sehr nahe an dem Licht des verwendeten Lasers (488 nm), welcher auf eine Messzelle gerichtet ist, durch die die mit Daunorubicin inkubierten Tumorzellen in laminarer Strömung fließen. Das Emissionsmaximum von Daunorubicin liegt bei $\lambda_{\text{em}} = 592 \text{ nm}$ (Chaires *et al.*, 1982). Die Bestrahlung lässt die Zellen entsprechend ihrer intrazellulären Akkumulation von Daunorubicin Licht unterschiedlicher Wellenlängen emittieren, welches mittels des Fluoreszenz-Band-Pass-Filters FL2 im Bereich von 560 nm bis 640 nm (rotes Licht) gemessen werden konnte.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Bestimmung der Nukleinsäure-Konzentration

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte in einem UV-Spektrometer bei einer Wellenlänge von 260 nm. Die Konzentration der DNA bzw. RNA kann unter Berücksichtigung der Verdünnung aus der gemessenen OD berechnet werden.

Es gilt: 1 OD_{260nm} entspricht 50 µg/ml doppelsträngiger DNA bzw. 40 µg/ml RNA. Um die Reinheit der Nukleinsäuren zu bestimmen, wurde zusätzlich die optische Dichte der Proben bei einer Wellenlänge von 280 nm (Protein-Absorptionsmaximum) gemessen und die Ratio berechnet.

3.2.2 Generierung doppelsträngiger Oligonukleotide

Das *Annealing* einzelsträngiger Oligonukleotide (Tab. 1) zur Generierung doppelsträngiger (ds) Oligonukleotide mit einer finalen Konzentration von 50 µM erfolgte nach 4 min 95 °C und 10 min RT in folgendem Ansatz (20 µl):

<i>Top strand</i> DNA Oligonukleotid	5 µl	(200 µM)
<i>Bottom strand</i> DNA Oligonukleotid	5 µl	(200 µM)
10x Oligo Annealing Buffer	2 µl	(2x)
A. dest.	8 µl	

Tab. 1: *Top-* und *Bottom strand* Oligonukleotide für Integration in pENTR/U6

<i>Top strand</i> MDR-C	5'-CAC CGT GTT GTC TGG ACA AGC ACT TTC AAG AGA AGT GCT TGT CCA GAC AAC A -3'
<i>Bottom strand</i> MDR-C	5'-AAA A TG TTG TCT GGA CAA GCA CT T CTC TTG AA A GTG CTT GTC CAG ACA ACA C-3'
<i>Top strand</i> MDR-D	5'-CAC CGT GTT GTC TGG ACA AGC ACT CCA CC A GTG CTT GTC CAG ACA ACA -3'
<i>Bottom strand</i> MDR-D	5'-AAA A TG TTG TCT GGA CAA GCA CT G GTG G AG TGC TTG TCC AGA CAA CAC -3'

Die eingerahmten Nukleotide entsprechen der *sense* bzw. *antisense* Zielsequenz auf der MDR1 mRNA (siehe Tab. 7), die zusammen mit der grau hinterlegten *loop*-Sequenz im Expressionsvektor als shRNA (*small hairpin*) abgelesen werden. Unmarkierte Nukleotide ermöglichen die Integration der ds-Oligonukleotide durch Komplementierung der 5'-Überhänge des Expressionsvektors pENTR/U6.

3.2.3 Enzymatische Modifikation und Fällung von DNA

Die Behandlung von DNA mittels Ligasen, Kinasen, Phosphatasen, Rekombinasen und Restriktionsendonukleasen, erfolgte nach den Vorgaben des Herstellers in 15 µl Ansätzen. Pro 1 µg DNA wurden 1 bis 5 *units* des jeweiligen Enzyms eingesetzt. Die Enzyme wurden durch Hitze (65 °C) oder durch Zugabe von 50 nM EDTA inaktiviert.

Die Fällung von DNA erfolgte durch Zugabe von Natriumazetat (3,5 M) in 100 % Ethanol über Nacht bei -20°C. Anschließend wurde die gefällte DNA für 30 min bei 14000 rpm und 4 °C pelletiert. Das Pellet wurde in kurzen Zentrifugationsschritten mehrfach mit 70 % Ethanol gewaschen, getrocknet und anschließend in A. dest. aufgenommen.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Zur Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte mittels Polymerasekettenreaktion wurde die *hot start* DNA-Polymerase *AmpliTaqGold* verwendet und folgender Ansatz pipettiert:

Ampli <i>TaqGold</i>	0,25 µl	(0,5 U)
Matrize (cDNA, genomische DNA, Plasmide)	10-100 ng	
dNTPs (je 10 mM)	0,5 µl	(200 µM)
5'-Primer (5 µM)	1,0 µl	(200 µM)
3'-Primer (5 µM)	1,0 µl	(200 µM)
10x PCR-Puffer (mit 15 mM MgCl ₂)	2,5 µl	(1x)
A. dest.	auf 25 µl	

Die Amplifikation erfolgte im Thermocycler mit folgendem Programm:

12 min	94 °C	Aktivierung des Enzyms
60 s	94 °C	Denaturierung der dsDNA
90 s	siehe Tab. 2	Hybridisierung der Primer
90 s	72 °C	Elongation der Primer mittels <i>Taq</i> -Polymerase
5 min	72 °C	Extension
∞	4 °C	Abkühlung

Die eingerahmten Schritte wurden je nach zu amplifizierendem Produkt 25- bis 35-mal wiederholt.

Die für die PCR eingesetzten Primer (Reinheitsgrad HPLC) wurden von MWG Biotech AG synthetisiert.

Tab. 2: Oligonukleotide für PCR, alphabetisch geordnet

Primer	Sequenz (5'-3')	T _{Annealing} (°C)	Fragmentgröße (bp)
18SrRNA/LC <i>forward</i>	GAT ATG CTC ATG TGG TGT TG	58	236
18SrRNA/LC <i>reverse</i>	AAT CTT CTT CAG TCG CTC CA		
Aldolase/Sonde <i>forward</i>	ATC GTG GCT GCA CAT GAG TC	56	249
Aldolase/Sonde <i>reverse</i>	GCC CTT GTC TAC CTT GAT GC		
CAR <i>forward</i>	CTT CAG GTG CGA GAT GTT ACG	58	237
CAR <i>reverse</i>	AGC CCA CTC TGT TTC TGA CTG		
E1A <i>forward</i>	ATG GCC GCC AGT CTT TTG	48	1040
E1A <i>reverse</i>	GCC ATG CAA GTT AAA CAT TAT C		
E2early <i>forward</i>	GGA TAG CAA GAC TCT GAC AAA G	50	240
E2early <i>reverse</i>	AGC TGA TCT TCG CTT TTG		
E2late <i>forward</i>	CCT TCT GCA GCT AGC CAA CTA C	58	348
E2late <i>reverse</i>	GTA ATG ACG CAG GCG GTA AG		
E2late/LC <i>forward</i>	CTA CCT TGC CTA CCA CTC TGA	65	351
E2late/LC <i>reverse</i>	GTA ATG ACG CAG GCG GTA AG		
E2late/Sonde <i>forward</i>	GTC GGA GAT CAG ATC CGC GT	60	1502
E2late/Sonde <i>reverse</i>	GGT CCT CGT CGT CTT CGC TT		
GAPDH <i>forward</i>	CAC CGT CAA GGC TGA GAA C	55	557
GAPDH <i>reverse</i>	ACC ACT GAC ACG TTG GCA G		
LacZ/LC <i>forward</i>	GAG GCT GAA GTT CAG ATG TGC G	64	514
LacZ/LC <i>reverse</i>	CAT CCA CCA CAT ACA GGC CGT AG		
MDR1/LC <i>forward</i>	CAG CTA TTC GAA GAG TGG GC	58	299
MDR1/LC <i>reverse</i>	CCT GAC TCA CCA CAC CAA TG		
SDM1 <i>forward</i>	CAG AAA AAA AGG ATC TCA AGA AGA	55	207
SDM2 <i>reverse</i>	ATA TTA TCA GAG TGG TCT CAT CAT ACA		
SDM3 <i>forward</i>	GCC TCA GAA GGT ACC TAA CCA	56	241
SDMut <i>reverse</i>	TTC TTA ATC GAT ATC AGT AAT ATT TGC A		
SDM1 <i>forward</i>	CAG AAA AAA AGG ATC TCA AGA AGA	55	331
SDM3 <i>reverse</i>	GCC TCA GAA GGT ACC TAA CCA		
YB-1/LC <i>forward</i>	CAA TGT AAG GAA CGG ATA TGG	55	310
YB-1/LC <i>reverse</i>	TTC CCC ACT CTC ACT ATT CTG		

3.2.5 Punktgerichtete Mutagenese mittels PCR

Zur Produktion von Adenoviren, die anti-MDR1-shRNAs unter der Kontrolle eines H1-Promotors exprimieren, wurden H1-anti-MDR1-shRNA Expressionskassetten aus den von Stege *et al.* (2004) generierten Expressionsplasmiden psiRNA/MDR-A, psiRNA/MDR-C bzw. psiRNA/MDR-D mittels PCR-Punktmutagenese nach Mikaelian und Sergeant (1992) amplifiziert (Abb. 5).

Die Mutagenese-PCR kommt zur Anwendung, um positionsspezifische Mutationen in doppelsträngige DNA einzuführen. Diese Vorgehensweise der Änderung von Sequenzen zur Einführung neuer Restriktionsstellen wurde gewählt, da keine kompatiblen Restriktionsstellen zur Umklonierung der H1-anti-MDR1-shRNA Expressionskassetten aus den psiRNA/MDR-Vektoren in den adenoviralen Rekombinationsvektor pShuttle zur Verfügung standen.

Deshalb wurden drei universelle Primer und ein Mutationsprimer synthetisiert (Tab. 2), von denen der eine (SDM1) vor den zu mutierenden Sequenzen, *upstream* des H1-Promotors bindet und die beiden anderen (SDM2 und SDM3) innerhalb sowie *downstream* des H1-Promotors. Der Mutageneseprimer (SDMut) enthält die einzuführende Mutation, die eine neue *EcoRV*-Schnittstelle durch den Austausch zweier Basen erzeugt (CT → TC). SDM2 besitzt an seinem 5'-Ende acht Basen, welche nicht komplementär zu den Basen der Zielsequenz sind (Abb. 5).

Es wurden zwei getrennte PCR-Reaktionen mit den Primern SDM1 / SDM2 und SDM3 / SDMut durchgeführt. Die PCR-Fragmente wurden über ein Agarosegel gereinigt (3.2.10), in gleichen Anteilen gemischt und als Matrize für eine dritte PCR mit den Primern SDM1 und SDM3 eingesetzt. Während dieser dritten PCR-Reaktion konnten die parentalen Fragmente nicht, dafür jedoch ausschließlich der mutierte Strang amplifiziert werden, da das 3'-Ende des Primers SDM2 nicht zur DNA-Sequenz komplementär ist.

Das amplifizierte Fragment, welches die H1-anti-MDR1-shRNA Expressionskassette konnte anschließend an seinen Termini mit *HindIII* und *EcoRV* geschnitten und in pShuttle integriert werden (3.5.2).

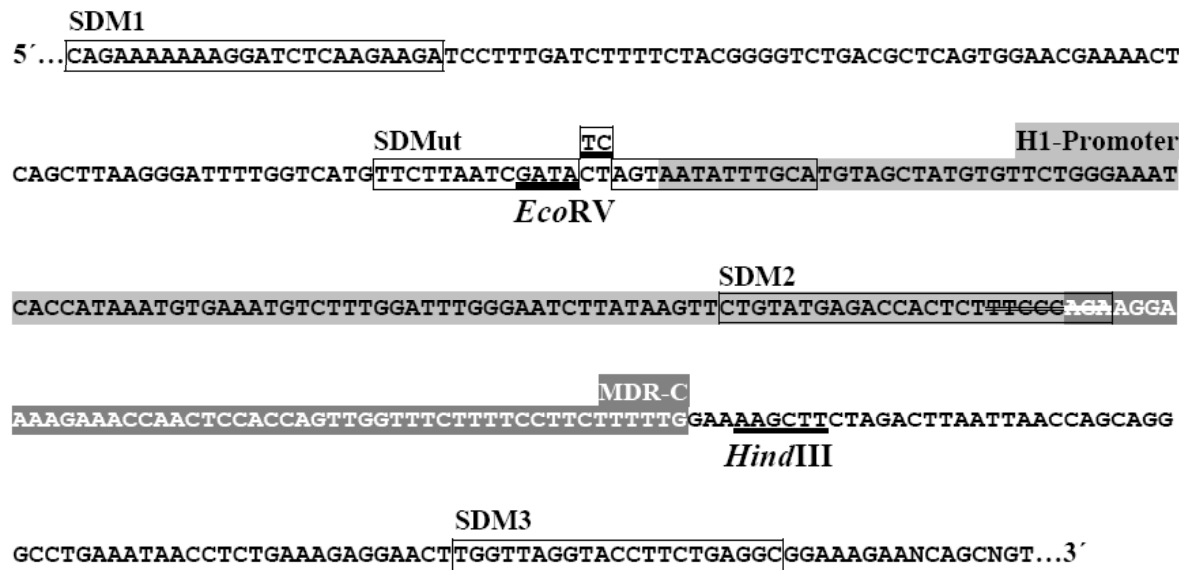


Abb. 5: Punktgerichtete Mutagenese zur Einführung einer *EcoRV*-Schnittstelle

Sequenzausschnitt aus psiRNA/MDR-C (umrahmt: Primerbindungsstellen; hellgrau hinterlegt: H1-Promotor; dunkelgrau hinterlegt mit weißer Schrift: shRNA-Konstrukt; unterstrichen: Restriktionsstellen)

3.2.6 Reverse Transkription

2 µg Gesamt-RNA (3.2.14) wurde mit Hilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase *SuperScript II* und Hexanukleotid-Zufallsprimern mit Hilfe des *SuperScript First-Strand Synthesis System* in cDNA transkribiert.

3.2.7 Quantitative *real time* RT-PCR

Für die quantitative Analyse einer spezifischen mRNA-Expression wurde ein *real-time* RT-PCR Protokoll (*SYBR-Green*) und der LightCycler verwendet. Die *real-time* RT-PCR-Ansätze waren wie folgt zusammengesetzt:

A. dest.	18 µl	
DNA Master SyBR Green I	2,0 µl	(1 x)
MgCl ₂ (25 mM)	2,4 µl	(4 mM)
5'-Primer (10 µM) siehe Tab. 2	1,0 µl	(500 nM)
3'-Primer (10 µM) siehe Tab. 2	1,0 µl	(500 nM)
CDNA (1:10)	2,0 µl	

Die Quantifizierung der Kopien jeder mRNA wurde durch serielle Verdünnung der jeweiligen in den Vektor pCR2.1 klonierten cDNA-Fragmente (10^7 bis 10^0 cDNA-Kopien) ermöglicht. Die Amplifikation erfolgte mit folgendem Programm: initiale Enzymaktivierung (10 min, 95 °C), gefolgt von 40 Zyklen bestehend aus 15 s Denaturierung (95 °C), 15 s entsprechender Annealing-Temperatur (Tab. 2) und 10 s Elongation bei 72 °C. Die genspezifische Fluoreszenz wurde bei 80 °C (CAR), 84 °C (18SrRNA, YB-1), 87 °C (E2Alate, MDR1), 88 °C (LacZ) bzw. 90 °C (Hexon) gemessen. In der vorliegenden Arbeit wurde der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green I* zur DNA-Detektion verwendet. Der Farbstoff interkaliert ausschließlich in doppelsträngige, nicht in einzelsträngige DNA. Durch die Interkalierung verstärkt sich die Fluoreszenz von *SYBR-Green I* um ein vielfaches. Das emittierte Fluoreszenzsignal ($\lambda_{em} = 520$ nm) ist proportional zur Menge der cDNA. Die Spezifität des Amplifikationsprodukts wurde mittels Schmelzkurvenanalyse bestätigt.

3.2.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Die Aufreinigung von PCR-Fragmenten erfolgte säulenchromatographisch mittels des *QIAquick PCR Purification Kits* nach Angaben des Herstellers.

3.2.9 Agarose-Gelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von RNA und DNA erfolgte in 1,0 oder 1,2 %igen [w/v] Agarosegelen in TAE-Puffer (0,8 mM Tris-Base, 0,4 mM Essigsäure, 1 mM EDTA, pH 8,0) mit 0,2 µg/ml Ethidiumbromid bei einer Spannung von 80-90 V. Als Größenstandards wurden 100 bp- oder 1 kb-DNA-Leitern verwendet. Nach Beendigung der Elektrophorese wurde die Auftrennung der Nukleinsäuren mittels eines UV-Transilluminators bei 254 nm detektiert.

3.2.10 Präparative Isolierung von DNA-Fragmenten

Die DNA-Extraktion aus Agarosegelen erfolgte säulenchromatographisch mittels *QIAquick Gel Extraction Kit* nach Angaben des Herstellers.

3.2.11 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierung unter Anwendung der in Tab. 3 aufgeführten Oligonukleotide erfolgte unter Verwendung eines ABI-373 DNA Sequenzierungsautomaten und des ABI PRISM *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* nach der Kettenabbruchmethode (Sanger *et al.*, 1977) durch Dr. M. Meixner am Institut für Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin. Die zu sequenzierende DNA wurde aufgereinigt und auf eine Konzentration von 100 ng/μl eingestellt.

Tab. 3: Oligonukleotide für Sequenzierung, alphabetisch geordnet

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')
BGH <i>reverse</i>	TAG AAG GCA CAG TCG AGG
pAdBLockiT <i>forward</i>	GAC TTT GAC CGT TTA CGT GGA GAC
pAdBLockiT <i>reverse</i>	CCT TAA GCC ACG CCC ACA CAT TTC
pENTR/U6 <i>forward</i>	CGA CTG GAT CCG GTA CCA AG
pENTR/U6 <i>reverse</i>	TGT TCG TTG CAA CAA ATT G
pShuttle/H1 <i>forward</i>	GAA GTG AAA TCT GAA TAA TTT TGT
pShuttle/H1 <i>reverse</i>	CAA AAC TAC ATA AFA CCC CCA C
T7 <i>forward</i>	TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG

3.2.12 Isolierung zellulärer DNA

Die Isolation zellulärer DNA aus adenoviral transduzierten Tumorzellen, die folglich auch Anteile adenoviraler DNA enthielt, erfolgte säulenchromatographisch mittels *Wizard SV Genomic DNA Purification Kit* nach Angaben des Herstellers.

3.2.13 Southern Blot Analyse

Zur Analyse des Anteils an adenoviraler DNA am Gesamt-DNA-Gehalt der transduzierten Tumorzellen und demnach zum Nachweis der Replikationskompetenz von Adenoviren in *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien, wurde eine Southern Blot Analyse durchgeführt. 2 μg zelluläre DNA (3.2.12) wurden mit der Restriktionsendonuklease *KpnI* 12 h bei 37 °C verdaut, anschließend gefällt (3.2.3) und mittels Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt (3.2.9). Das Agarosegel wurde unter leichtem Schwenken bei RT 2x 15 min in Denaturierungslösung (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) und 2x 15 min in Neutralisationslösung (1,5 M NaCl, 1 M Tris-Base, pH 7,4) inkubiert.

3.2.13.1 Kapillartransfer

Der Transfer der DNA auf eine Nylonmembran erfolgte in 10x SSC (1,5 M NaCl, 0,15 M Na₃-Citrat) mittels reversem Kapillarblotverfahren (Ausubel *et al.*, 1998). Zu diesem Zweck wurden auf eine 10 cm hohe Zellosoeschicht zwei gelgroße, in 10x SSC getränkte Chromatographiepapierstreifen, die nukleinsäureabsorbierende Nylon-Membran und das DNA-Gel geschichtet. Es folgten zwei angefeuchtete Chromatographiepapiere sowie ein in 10x SSC getränkter Schwamm. Der Kapillartransfer der DNA aus dem Gel in die Nylon-Membran erfolgte über Nacht. Die abschließende Inkubation im UV-Crosslinker (3 min bei 120.000 mJ/cm²) fixierte die DNA auf der Membran.

3.2.13.2 Radioaktive Sondenmarkierung

Als Sonden für die radioaktive Hybridisierung wurden mittels *Megaprime DNA Labelling System* markierte PCR-Produkte (Tab. 2) verwendet. Zu diesem Zweck wurden 25 ng PCR-Produkt nach Angaben des Herstellers unter Einbau von ³²P-dCTP markiert.

3.2.13.3 Radioaktive Hybridisierung

Die Prähybridisierung der auf die Nylonmembran fixierten DNA erfolgte mit *ExpressHyb* Hybridisierungslösung bei 65 °C für 1 h. Für die Hybridisierung, die bei 58 °C über Nacht erfolgte, wurde die radioaktiv markierte Sonde (3.2.13.2) hinzugefügt. Am nächsten Tag wurden die Membranen 2x 30 min bei 37 °C mit Waschpuffer I (2x SSC, 0,1 % SDS) und 2x 30 min bei 55 °C mit Waschpuffer II (0,1x SSC, 0,1 % SDS) gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Die Exposition der hybridisierten Membranen bei –80 °C fand in Expositions-kassetten mit Verstärkerfolien statt.

Für eine wiederholte Hybridisierung einer Membran mit einer anderen Sonde, wurden die Membranen in 0,5 % SDS aufgekocht, um bereits gebundene Sondenmoleküle zu entfernen.

3.2.14 Isolation zellulärer RNA

Für die Aufreinigung der gesamten transkribierten RNA aus Tumorzellen wurde das Protokoll für das *RNeasy Mini-Kit* nach Angaben des Herstellers ausgeführt.

3.2.15 Northern Blot Analyse

Die Northern Blot Analyse wird zum Nachweis spezifischer RNA-Sequenzen in einem Gemisch aus Gesamt-RNA angewendet. Zur Auftrennung von RNA wurde ein 1 %iges Agarosegel mit MOPS-Puffer (0,2 M MOPS, 0,5 M Natriumazetat, 0,01 M EDTA, pH 7,0) und 6 % Formaldehyd verwendet.

5-10 µg RNA wurden gleichmäßig mit RNA-Ladepuffer versetzt, bei 65 °C für 10 min denaturiert, anschließend auf Eis gestellt und gelelektrophoretisch bei einer Spannung von 80 V in MOPS-Puffer aufgetrennt.

Die Methoden des Transfers der RNA auf die Nylonmembran, deren Fixierung sowie radioaktiven Hybridisierung entsprechen den Methoden der Southern Blot Analyse (3.2.13).

3.2.16 siRNA Expressionsnachweis

Nach der Transduktion von Tumorzellen mit adenoviralen Vektoren, in deren Genom shRNA-Expressionskassetten integriert sind, erfolgte der Nachweis der innerhalb der Tumorzellen durch den *Dicer* prozessierten siRNA-Moleküle in folgenden Schritten:

3.2.16.1 Isolation von miRNA

Die Isolation und Anreicherung von micro RNAs (< 200 nt) erfolgte mittels *mirVana miRNA Isolation Kit* nach Angaben des Herstellers.

3.2.16.2 Auftrennung und Transfer von miRNA

Der Nachweis von prozessierten siRNAs wurde nach einem modifizierten Protokoll für die Northern Blot Analyse ausgeführt. Zur Auftrennung der angereicherten miRNA (3.2.16.1) bei 250 V, wurden 5 µg miRNA in RNA-Ladepuffer bei 65 °C für 10 min denaturiert, anschließend auf Eis inkubiert und auf ein 15 %iges denaturierendes Acrylamid-Gel in einer vertikalen Aparatur in TBE-Puffer (90 mM Tris-Base, 90 mM Borsäure, 2 mM EDTA) aufgetragen. Abschließend wurde das Gel für 10 min in 10x SSC inkubiert, die angereicherte und nach ihrer Größe aufgetrennte miRNA mittels reversem Kapillarblotverfahren über 24 h auf eine Nylon-Membran transferiert und UV-fixiert (3.2.13.1).

3.2.16.3 Radioaktive Sondenmarkierung

Als Sonden zum Nachweis der innerhalb der Tumorzellen adenoviral exprimierten siRNA-Moleküle und der U6 snRNA (*small nuclear*) zur Beladungskontrolle, wurden 10 pmol der *antisense* DNA-Oligonukleotide (Tab. 4) mittels T4-Polynukleotidkinase und ^{32}P -dATP nach Angaben des Herstellers endmarkiert.

Tab. 4: Oligonukleotide für radioaktive Hybridisierung

Oligonukleotid	Sequenz (5'-3')	T _{Hybridisierung} (°C)
MDR-C <i>antisense</i>	AGT GCT TGT CCA GAC AAC A ¹	42
U6 snRNA	TAT GGA ACG CTT CAC GAA TTT GC ²	30

⁽¹⁾ Stege *et al.*, 2004; ⁽²⁾ Scherr *et al.*, 2005

3.2.16.4 Radioaktive Hybridisierung

Die Prähybridisierung der auf die Nylonmembran fixierten miRNA erfolgte bei 65 °C in einer Prähybridisierungslösung (6x SSC, 10x Denhardt's Reagenz, 0,2 % SDS) für 1 h. Die eigentliche Hybridisierung der miRNA in 0,1x SSC, 5x Denhardt's Reagenz und 0,2 % SDS mit 10 pmol radioaktiv markierten Oligonukleotiden erfolgte für 16 h bei in Tab. 4 angegebenen Temperaturen. Am Folgetag wurden die Membranen 2x 30 min bei RT mit einer Lösung bestehend aus 6x SSC und 0,2 % SDS gewaschen, um unspezifisch gebundene Sonde zu entfernen. Die Exposition der hybridisierten Membranen bei -80 °C fand in Expositionskassetten mit Verstärkerfolien statt.

3.2.17 Isolierung zellulärer Proteine

Zur Isolation des Gesamtproteingehalts von Tumorzellkulturen wurden diese zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, auf Eis inkubiert, mit Ripapuffer (50 mM Tris-Base, 5 mM EGTA, 150 mM NaCl, 1 % Triton X-100, Proteinaseinhibitoren) versetzt und für 30 min auf Eis lysiert. Anschließend wurde das Zelllysate mittels Zellschaber vom Boden der Zellkulturschale abgelöst und 15 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde im Verhältnis 1:3 mit 4x Proteinprobenpuffer (60 mM Tris-Base, 100 mM DTT, 2 % SDS, 10 % Glycerol, 1 % Bromphenolblau) versetzt, 10 min bei 95 °C denaturiert und anschließend für 5 min bei 14000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Die im Überstand befindlichen Gesamtproteine wurden bei -80 °C gelagert.

3.2.18 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mittels einer modifizierten Methode nach Dieckmann-Schuppert und Schnittler (1996) bestimmt. Diese ermöglicht die Messung von Proteinproben, die in SDS-Probenpuffer gelöst sind.

Dafür wurden auf eine Nitrozellulosemembran jeweils 1 µl der zu bestimmenden Proteinlösungen pipettiert (Doppelbestimmung) und für 1 min in Amidoschwarzlösung (0,1 % Amidoschwarz, 10 % Essigsäure, 45 % Methanol) angefärbt. Als Proteinstandard wurde eine BSA-Verdünnungsreihe (0,5-10 mg/ml BSA) analog eingesetzt. Nach dem Verwerfen der Färbelösung wurde die Membran in der Entfärbelösung (90 % Methanol, 2 % Essigsäure) solange geschwenkt, bis der Membranhintergrund wieder entfärbt war, während die Proteinpunkte durch den gebundenen Farbstoff sichtbar wurden. Diese wurden á 0,5 cm² aus der Nitrozellulosemembran ausgeschnitten und das gebundene Amidoschwarz in jeweils 1 ml Elutionslösung (50 % Ethanol, 500 µM EDTA, 25 mM NaOH) unter starkem Schütteln 20 min bei RT eluiert. Abschließend wurde die Extinktion bei 630 nm gemessen und die Proteinkonzentration mit Hilfe der BSA-Eichgerade berechnet.

3.2.19 Western Blot Analyse

3.2.19.1 Auftrennung und Transfer von Proteinen

10-20 µg Gesamtproteine wurden in 2x Proben-Puffer 5 min bei 95 °C denaturiert, kurz auf Eis inkubiert und mittels Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) nach deren Molekulargewicht aufgetrennt. Die SDS-PAGE nach Laemmli (1970) erfolgte mittels 4,0 %igem Sammelgel und anschließend 7,5 %igem Trenngel in einer vertikalen Elektrophorese-Apparatur in Glyzin-SDS-Puffer (150 mM Glyzin, 0,1 % SDS, 25 mM Tris-Base) zunächst für 30 min bei 60 V und anschließend 95 V.

7,5 %iges Trenngel

Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	3,75 ml
10 % SDS	200 µl
1 M Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 ml
10 % APS	150 µl
TEMED	15 µl
A. dest.	8,4 ml

4,0 %iges Trenngel

Acrylamid-Bis-Acrylamid (19:1)	1,0 ml
10 % SDS	100 µl
0,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	2,5 ml
10 % APS	75 µl
TEMED	15 µl
A. dest.	6,4 ml

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Gesamtproteine wurde das Sammelgel verworfen. Trenngel, Nitrozellulosemembran und Chromatographiepapierstreifen wurden in Transferpuffer (150 mM Glyzin, 20 % Methanol, 25 mM Tris-Base) äquilibriert und in der *semi-dry* Blotapparatur nach Angaben des Herstellers angeordnet. Der Transfer der nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennten Proteine auf die Nitrozellulosemembran erfolgte für 1 h bei 12 V.

3.2.19.2 Antikörper-Reaktion und Detektion mittels Chemolumineszenz

Durch Inkubation der Membran mit einem Primärantikörper (2 h, 16 °C), anschließenden Waschschritten [4x 7 min mit TBST (150 mM NaCl, 43 mM Tris-HCl, 7 mM Tris-Base, 0,05 % Tween 20, pH 7,4-7,6)] und der Behandlung mit dem entsprechenden sekundären Antikörper (1 h, 16 °C) kann mittels Chemilumineszenz-Reaktion eine spezifische Proteinbande sichtbar gemacht werden. Die Verdünnungen der in dieser Arbeit eingesetzten Antikörper sind Tab. 5 zu entnehmen. Prinzipiell reagiert hierbei der spezifische Primärantikörper mit dem zu untersuchenden Protein, welches an der Nitrocellulose-Membran gebunden ist, während der mit einer Peroxidase modifizierte sekundäre Antikörper wiederum mit dem primären Antikörper reagiert. Die Antikörperbindung wurde mittels *Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate* nach den Angaben des Herstellers detektiert. Die Exposition der Blots erfolgte auf *Hyperfilm ECL*.

Für eine erneute Antikörperinkubation eines Blots wurden die gebundenen Antikörper mittels *Western Blot Recycling Kit* nach den Angaben des Herstellers entfernt.

Tab. 5: Primär- und Sekundärantikörper

Primärantikörper	Verdünnung
<i>Rabbit anti-YB-1</i>	1:1000
Mouse monoclonal anti-Actin	1:5000
<i>Mouse monoclonal anti-β-Galaktosidase</i>	1:100
<i>Mouse monoclonal anti-P-gp (C219)</i>	1:100
Sekundärantikörper	Verdünnung
<i>Goat anti-Mouse IgG (H+L), Peroxidase konjugiert</i>	1:10000

3.2.20 Immunzytochemischer Nachweis von Proteinen

Zur Detektion spezifischer Proteine innerhalb einer Tumorzellpopulation wurden die Zellen auf Objektträgern ausgesät und bis zum Erreichen der gewünschten Konfluenz im Brutschrank inkubiert. Danach wurden die Objektträger mit PBS gewaschen, die darauf befindlichen Zellen mit einer Methanol-Azeton-Lösung (v/v) für 10 min bei $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ fixiert und luftgetrocknet. Die endogene Peroxidase wurde für 5 min in 3 % H_2O_2 blockiert. Dies war erforderlich, da die Substrat-Chromogenreaktion, mit der die Peroxidase des Streptavidin-Biotin-Komplexes sichtbar gemacht wird, keine Unterscheidung zulässt, ob es sich bei der Anfärbung um das nachzuweisende Protein, welches durch die Immunreaktion das zelluläre Antigen lokalisiert oder ob es sich um bereits innerhalb der Tumorzelle vorkommende endogene Peroxidaseaktivität handelt. Die von Dr. Pawel Surowiak durchgeführte immunologische Färbereaktion erfolgte für 1 h bei RT mit *Antibody Diluent* 1:100 verdünnten Primäantikörpern (Tab. 5). Parallel wurde zu jeder Reaktion eine Negativkontrolle angesetzt, durchgeführt mit *Primary Mouse Negative Control*. Die Antigene wurden mit Hilfe biotinylierter Antikörper (15 min bei RT), Streptavidin-Peroxidase-Komplex (15 min bei RT) und NovaRed (10 min bei RT) sichtbar gemacht. Danach erfolgten eine Gegenfärbung und die Dehydrierung der Präparate mit Mayer's Hematoxylin, die daraufhin im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet werden konnten.

3.3 Bakterien und Bakterienkultur

Die in dieser Arbeit verwendeten DNA-Vektoren (siehe Anhang, Abb. 37) wurden in den *E. coli*-Stämmen TOP10, DH10B oder BJ5183 (Tab. 6) vermehrt. Die Kultivierung der Bakterien erfolgte bei 37 °C bzw. 34 °C (Plasmide > 30 kb) in LB-Medium (0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton, 0,6 % NaCl) und auf LB-Agar-Platten (LB-Medium, 1,5 % Agar). Die Antibiotika wurden in den Konzentrationen Carbenicillin 100 µg/ml und Kanamycin 50 µg/ml hinzugegeben.

Tab. 6: Verwendete Bakterienstämme

Bakterienstamm	Genotyp
BJ5183 (Stratagene)	endA1 sbcBC recBC galK met thi-1 bioT hsdR (Str ^r)
DH10B (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 endA1 ara Δ139 Δ(ara, leu)7697 galU galK λ- rpsL (Str ^R) nupG
TOP10 (Invitrogen)	F ⁻ mcrA Δ(mrr-hsdRMS-mcrBC) Φ80lacZΔM15 ΔlacX74 recA1 deoR araD139 Δ(ara-leu)7697 galU galK rpsL (Str ^R) endA1 nupG

3.3.1 Transformation

3.3.1.1 Herstellung chemokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung chemokompetenter TOP10 und DH10B wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml Übernachtskultur des jeweiligen *E. coli* Stammes versetzt und bei 37 °C und 200 rpm, 12 h geschüttelt. Die Bakterienkultur wurde zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C), das Pellet in 100 ml eiskaltem 50 mM CaCl₂ gewaschen und erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Dann wurde es vorsichtig in 5 ml 50 mM CaCl₂, 10 % Glycerin resuspendiert, aliquotiert und bei -80 °C eingefroren.

3.3.1.2 Transformation chemokompetenter *E. coli*

Zur Transformation von DNA aus Ligationsansätzen in chemokompetente *E. coli* wurden 10-100 ng DNA mit 50 µl chemokompetenten Zellen versetzt und für 30 min auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz für 45 s bei 42 °C hitzegeschockt und für weitere 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 250 µl SOC-Medium zugesetzt, die transformierte Bakteriensuspension 1 h bei 200 rpm und 37 °C geschüttelt und davon 50-100 µl auf antibiotikahaltige LB-Agarplatten ausplattiert. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37 °C.

3.3.1.3 Herstellung elektrokompetenter *E. coli*

Zur Herstellung elektrokompetenter BJ5183 wurden 500 ml LB-Medium mit 5 ml Übernachtskultur des *E. coli* Stammes BJ5183 angeimpft. Nach 12 h Inkubation (200 rpm, 37 °C) wurde der Ansatz 30 min auf Eis gestellt und anschließend abzentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Das Pellet wurde in 250 ml eiskaltem, sterilen Wasser aufgenommen und erneut zentrifugiert (3000 rpm, 10 min, 4 °C). Dieser Schritt wurde mit 50 ml eiskaltem, sterilen Wasser wiederholt. Dann wurden die Zellen in 5 ml eiskaltem, 10 %igem Glycerin aufgenommen und erneut wie oben zentrifugiert. Dieser Schritt wurde mit 2,5 ml eiskaltem 10 %igem Glycerin wiederholt. Die Zellen wurden anschließend in 500 µl 10 %igen Glycerin aufgenommen, aliquotiert und bei –80 °C gelagert.

3.3.1.4 Transformation elektrokompetenter *E. coli*

Für die Elektroporation 50 µl elektrokompetenter *E. coli* BJ5183 wurden 10-100 ng Plasmid-DNA eingesetzt. DNA und Elektroporationsküvetten (0,1 cm Elektrodenabstand) wurden auf Eis vorgekühlt. Die zu kotransformierenden Plasmide (3.5.2) wurden zu den elektrokompetenten Bakterien pipettiert und eine Minute auf Eis inkubiert. Dann wurde der Ansatz in eine Elektroporationsküvette gegeben und bei 25 µF, 200 Ω und 1,25 kV elektroporiert (GeneZapper 450/2500). Es wurde darauf geachtet, dass die Zeitkonstante zwischen 4,5 und 4,7 ms lag. Nach der Elektroporation wurde den transformierten *E. coli* sofort 600 µl warmes LB-Medium zugegeben. Anschließend wurde diese Bakteriensuspension 1 h bei 37 °C schüttelnd (200 rpm) inkubiert und 50-100 µl des Ansatzes auf Selektionsplatten ausplattiert.

3.3.2 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Die Präparation von Plasmid-DNA aus allen *E. coli* Stämmen erfolgte nach Birnboim und Doly (1979) unter Verwendung von *QIAprep Mini-Midi-* bzw. *Maxiprep* Kits. Zu diesem Zweck wurden Flüssigkulturen von einzelnen Kolonien in 5 ml (Miniprep), 50 ml (Midiprep) bzw. 500 ml (Maxiprep) angelegt und 12-18 h auf dem Schüttler bei 37 °C inkubiert. Die Aufarbeitung der Kulturen geschah nach Herstellerangaben. Bei dem verwendeten System schloss sich an die alkalische Lyse der Zellen die Bindung der Plasmide an eine Anionenaustauschsäule an. Die Elution erfolgte mit 30 µl TE-Puffer. Qualität und Quantität der DNA wurden photometrisch bestimmt (3.2.1).

3.4 RNAi-Technologie

RNA-Interferenz, eine Technologie, mit der die Expression eines spezifischen Proteins reduziert oder eliminiert werden kann, hat sich zu einer potentiellen Behandlungsmöglichkeit unterschiedlichster Krankheiten entwickelt. Dass doppelsträngige RNA-Moleküle durch Homologie Gene „stumm schalten“ können, wurde erstmals von Andrew Z. Fire und Craig C. Mello in *Caenorhabditis elegans* belegt (Fire *et al.*, 1998), die dafür den Nobelpreis für Medizin 2006 erhielten.

Small interfering RNA (siRNA) und *small hairpin RNA* (shRNA) sind doppelsträngige Nukleinsäuren, die durch ihre Homologie zu einem definierten mRNA-Abschnitt eines Zielproteins dessen Proteinbiosynthese durch endonukleolytische Spaltung der betreffenden mRNA verhindern können (*post transcriptional silencing*).

3.4.1 H1- und U6-Promotor

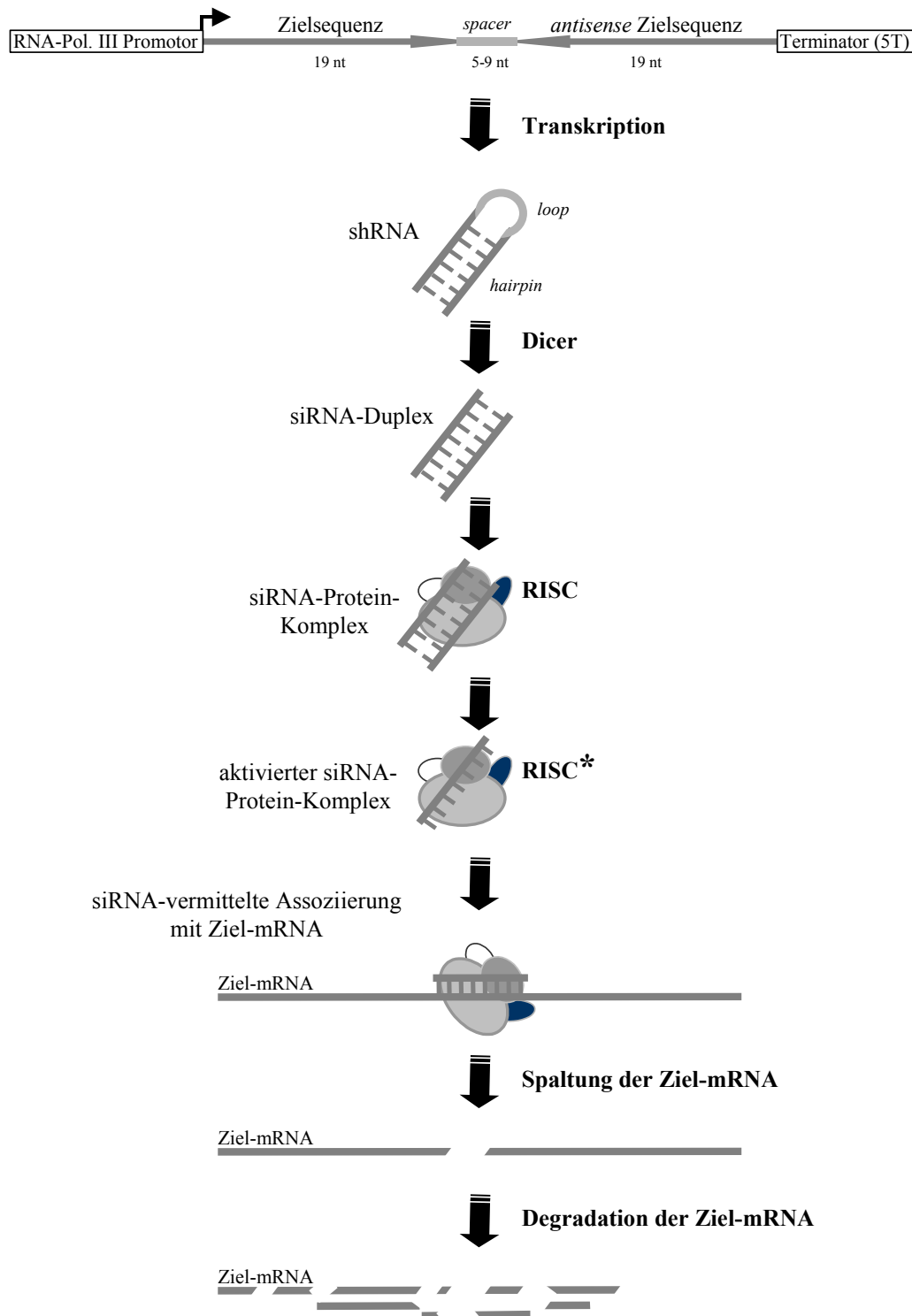
Für die Transkription von RNA sind eukaryotische RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren wie der H1-Promotor oder der U6-Promotor vorteilhaft. Solche Promotorsequenzen können *in vivo* die Expression von 5S rRNA, tRNA, U6 snRNA und anderer kleiner stabiler RNA-Moleküle, die in bei der RNA-Prozessierung involviert sind, bewirken (Paule und White, 2000). Die RNA-Polymerase III erkennt beide Promotoren und verfügt über eine hohe Transkriptionsrate von $\sim 1\text{-}4 \times 10^5$ Transkripte pro Zelle (Kappel *et al.*, 2006) und hat - was besonders vorteilhaft ist - ein exaktes Terminationssignal (5 Thymidine) und ist in den meisten Säugerzellen aktiv. Der Abbruch des Transkripts nach dem Terminationssignal erfolgt nach dem zweiten Uridin. Dabei entsteht ein 2 nt 3' Überhang (Brummelkamp *et al.*, 2002; Tiscornia *et al.*, 2003). Die H1- und U6 vermittelte Transkription von shRNAs ist beispielsweise in HEK-293A-Zellen in ihrer Effizienz beinahe identisch (Hao *et al.*, 2005).

3.4.2 RNAi-Mechanismus

Folgende Erläuterungen sind in (Abb. 6) schematisch dargestellt. Um wie innerhalb dieser Arbeit ein Gen nach seiner Transkription abzuschalten, wird eine ca. 50 nt lange DNA Sequenz, die für eine shRNA kodiert, *downstream* eines Polymerase III-Promotors und gefolgt von einer Terminationssequenz, in einen adenoviralen oder Plasmid-Vektor kloniert. Diese DNA Sequenz besteht aus der 19 nt langen Genzielsequenz und ihrer *antisense* Sequenz in invertierter Orientierung, separiert durch eine 5 bzw. 9 nt lange *spacer*-Sequenz. Wenn diese Sequenzfolge transkribiert wird, faltet sich die RNA automatisch und generiert eine shRNA (*small hairpin*).

Eine RNase III (*Dicer*) spaltet zytoplasmatische dsRNA in 19-23 nt lange dsRNA-Fragmente mit 5'phosphorylierten Enden, 3'OH-Enden und ungepaarten 2 nt-Überhängen. Durch den *Dicer* wird die shRNA durch die Entfernung der *spacer*-Sequenz (*loop*) in einen siRNA-Duplex prozessiert (Ketting *et al.*, 2001).

Das doppelsträngige siRNA-Molekül wird dann in den *RNA-induced silencing complex* (RISC) inkorporiert. Dieser Komplex entwindet den siRNA-Duplex in einer ATP-abhängigen Reaktion und wird damit aktiviert (RISC*). Nach der Entwindung dissoziiert einer der beiden siRNA-Stränge und wird degradiert, während der andere Strang weiterhin mit dem RISC* assoziiert bleibt. Der RISC* ist nach seiner Aktivierung mit Ribosomen assoziiert und erkennt potentielle mRNA-Substrate vermutlich während ihrer Translation. Die Erkennung erfolgt über homologe Hybridisierung der zellulären komplementären mRNA mit der siRNA innerhalb des RISC*. Die Ziel-mRNA wird anschließend endonukleolytisch gespalten. Da nun die Enden der mRNA nicht mehr länger durch 5' cap- und a 3' poly(A)-Überhänge geschützt sind, werden die freien Enden der gespaltenen mRNA-Fragmente durch zelluläre RNasen in kürzester Zeit degradiert. Während dessen verbleibt die siRNA im RISC* und kann einen neuen mRNA-Degradationszyklus einleiten (Elbashir *et al.*, 2001; Hannon, 2002; Plasterk, 2002; Dykxhoorn *et al.*, 2003).

shRNA Expressionskassette**Abb. 6: Schematische Übersicht der siRNA-vermittelten RNA-Interferenz**(modifiziert und kombiniert nach Ketting *et al.*, 2001 und Dykxhoorn *et al.*, 2003)

3.5 Adenovirale Methoden

3.5.1 Verwendete Adenoviren

Die innerhalb dieser Arbeit verwendeten adenoviralen Vektoren enthalten Sequenzabschnitte des humanen Adenovirus Subtyp C, Serogruppe 5 (Ad5 1-458 und 3513-35935), d.h. alle Elemente wie 5' und 3' ITRs (*inverted terminal repeats*), Verpackungssignal, E2 und E4 Regionen und späte adenovirale Gene, die die Verpackung des Expressionskonstrukts in Virione (infektiöse Viruspartikel) erlauben (Hitt *et al.*, 1995; Russell, 2000).

Die als Ad5/U6 bezeichneten replikationsinkompetenten Adenoviren resultieren aus dem E1- und E3 deletierten Expressionsvektor pAd/BLOCK-iT (Invitrogen). Dieser trägt einen U6-Promotor, *downstream* dessen für anti-MDR1-shRNAs kodierende DNA-Sequenzen integriert werden können.

Der ebenfalls E1- und E3 deletierte 33,4 kb große adenovirale Vektor pAdEasy-1 (Stratagene) enthält keinen Polymerase III-Promotor. In diesen wurden vollständige H1-RNAi-Expressionskassetten integriert. Die somit mittels H1-Promotor anti-MDR1-shRNA exprimierenden Adenoviren wurden folgend als Ad5/**H1** benannt.

Die Zielsequenzen der anti-MDR1 shRNAs (Tab. 7) für die RNAi-vermittelte Inhibition der MDR1 Expression wurden bereits im Vorfeld mittels transienter siRNA-Experimente bestätigt (Nieth *et al.*, 2003). Zwei verschiedene Zielsequenzen auf der MDR1 mRNA wurden untersucht und im folgenden als MDR-A (nt-Positionen 499-517) und MDR-C (bzw. MDR-D, nt-Positionen 3051-3069) bezeichnet (Tab. 7). MDR-C und MDR-D interagieren mit der gleichen MDR1 mRNA Zielsequenz. Diese schließt eine bekannte MDR1-Ribozymschnittstelle ein (Holm *et al.*, 1994). Ihre durch Polymerase III Promotoren abgelesenen shRNA-Strukturen unterscheiden sich ausschließlich in der Länge ihrer *loop*-Sequenz (MDR-C: 9 nt loop, MDR-D: 5 nt loop). Dies erlaubte die Untersuchung, ob *stem-loop*-Konstrukte unterschiedlicher Länge und Stabilität einen Einfluss auf die Effizienz der Entstehung von siRNA-Molekülen ausüben.

Als Spezifitäts- bzw.- Negativkontrolle wurde eine anti-**LacZ** shRNA Expressionskassette unter der Kontrolle eines U6-Promotors in das adenovirale Genom integriert. Aus den nach Adenovirusinfektion mit Ad5U6/**LacZ** innerhalb der Tumorzellen transkribierten anti-LacZ shRNAs werden durch das zelluläre Enzym *Dicer* siRNAs generiert. Diese spezifischen anti-LacZ siRNAs können mit keiner mRNA innerhalb der Tumorzellen interagieren und

diese durch endonukleolytische Spaltung zerstören. Deshalb konnten die erzielten RNAi-Effekte der oben beschriebenen anti-MDR1 shRNA Konstrukte unabhängig vom adenoviralen Vektorsystem untersucht werden. Tab. 7 gibt einen Überblick über die verwendeten mRNA-Zielsequenzen.

Tab. 7: anti-MDR1 und anti-LacZ Zielsequenzen auf der jeweiligen mRNA

shRNA	Zielsequenz auf der mRNA	nt-Position ¹	loop-Sequenz
MDR-A	5'-GAA GGA AAA GAA ACC AAC U-3'	499-517	CCACC ²
MDR-C	5'-UGU UGU CUG GAC AAG CAC U-3'	3051-3069	TTCAAGAGA ³
MDR-D	5'-UGU UGU CUG GAC AAG CAC U-3'	3051-3069	CCACC ²
LacZ	5'-CUA CAC AAA UCA GCG AUU U-3'	364872-364852	CGAA ⁴

⁽¹⁾ Positionen der MDR1 Nukleotide entsprechen der humanen MDR1/P-gp kodierenden mRNA-Sequenz (*GeneBank accession number*: NM_000927.3); die LacZ Zielsequenz entspricht der LacZ β -D-Galaktosidase Sequenz von *E. coli* K12 (*GeneBank accession number*: NC_000913.2); ⁽²⁾ Brummelkamp *et al.*, 2002; ⁽³⁾ Jacque *et al.*, 2002; ⁽⁴⁾ BLOCKiT manual (Invitrogen).

3.5.2 Produktion rekombinanter Adenoviren

Die unter der Kontrolle eines U6-Promotors anti-MDR1-shRNA exprimierenden Adenoviren (Ad5/U6) wurden wie in Abb. 7A schematisch dargestellt, in drei Schritten hergestellt:

- (A1) Hybridisierung (3.2.2) und Klonierung (3.2.3) der *top*- und *bottom*-Stränge, die entsprechend der Zielsequenzen in der MDR1 mRNA (Tab. 7) unter Berücksichtigung der kohäsiven 5'-Überhänge des Expressionsvektors pENTR/U6 synthetisiert wurden (Tab. 1).
- (A2) Homologe *in vitro* Rekombination über zwei die anti-MDR1-shRNA Expressionskassette flankierende Rekombinationsseiten (recL und recR) zwischen Adenovirus-*Backbone*-Vektor pAd/BLOCK-iT/DEST und dem in Schritt A1 klonierten pENTR/U6 Vektor mittels LR-Clonase nach Angaben des Herstellers. Die Selektion der Rekombinanten erfolgte in *E. coli* TOP10 (3.3.1.2) über ein im pAd/BLOCK-iT/DEST kodiertes Ampicillin-Resistenzgen.
- (A3) Restriktion der rekombinanten adenoviralen shRNA-Expressionsvektoren mit *PacI* (3.2.3), um die invertierten terminalen Wiederholungssequenzen (*inverted terminal repeats*, ITR) zu expositionieren und Transfektion in HEK-293A (3.1.3.1).

Der Entstehungsprozess der unter Kontrolle eines H1-Promotors anti-MDR1-shRNA exprimierenden Adenoviren (Ad5/H1) umfasst vier Schritte, die in Abb. 7B dargestellt sind:

- (B1)** Amplifikation der H1-RNAi-Expressionskassette aus den Expressionsvektoren psiRNA/MDR-A, psiRNA/MDR-C bzw. psiRNA/MDR-D (Stege *et al.*, 2004) durch punktgerichtete Mutagenese mittels PCR (3.2.5).
- (B2)** *EcoRV* und *HindIII* Doppelverdau (3.2.4) und Klonierung der H1-anti-MDR1 shRNA-Expressionskassette in den Transfervektor pShuttle (Stratagene) und Selektion in *E. coli* TOP10 (3.3.1.2) über Ampicillin.
- (B3)** Homologe *in vivo* Rekombination (*recL*, *recR*) zwischen dem superhelikalen Adenovirus-*Backbone*-Vektor pAdEasy-1 und dem in Schritt B1 klonierten pShuttle Vektor mittels Kotransformation beider Plasmide in den Bakterienstamm *E. coli* BJ5138 (3.3.1.4). Die Selektion der Rekombinanten erfolgte über ein in pAdEasy-1 kodiertes Kanamycin-Resistenzgen.
- (B4)** Produktion rekombinanter Adenoviren durch Transfektion der linearisierten (*PacI*) rekombinanten Vektoren in HEK-293A-Zellen (3.1.3.1).

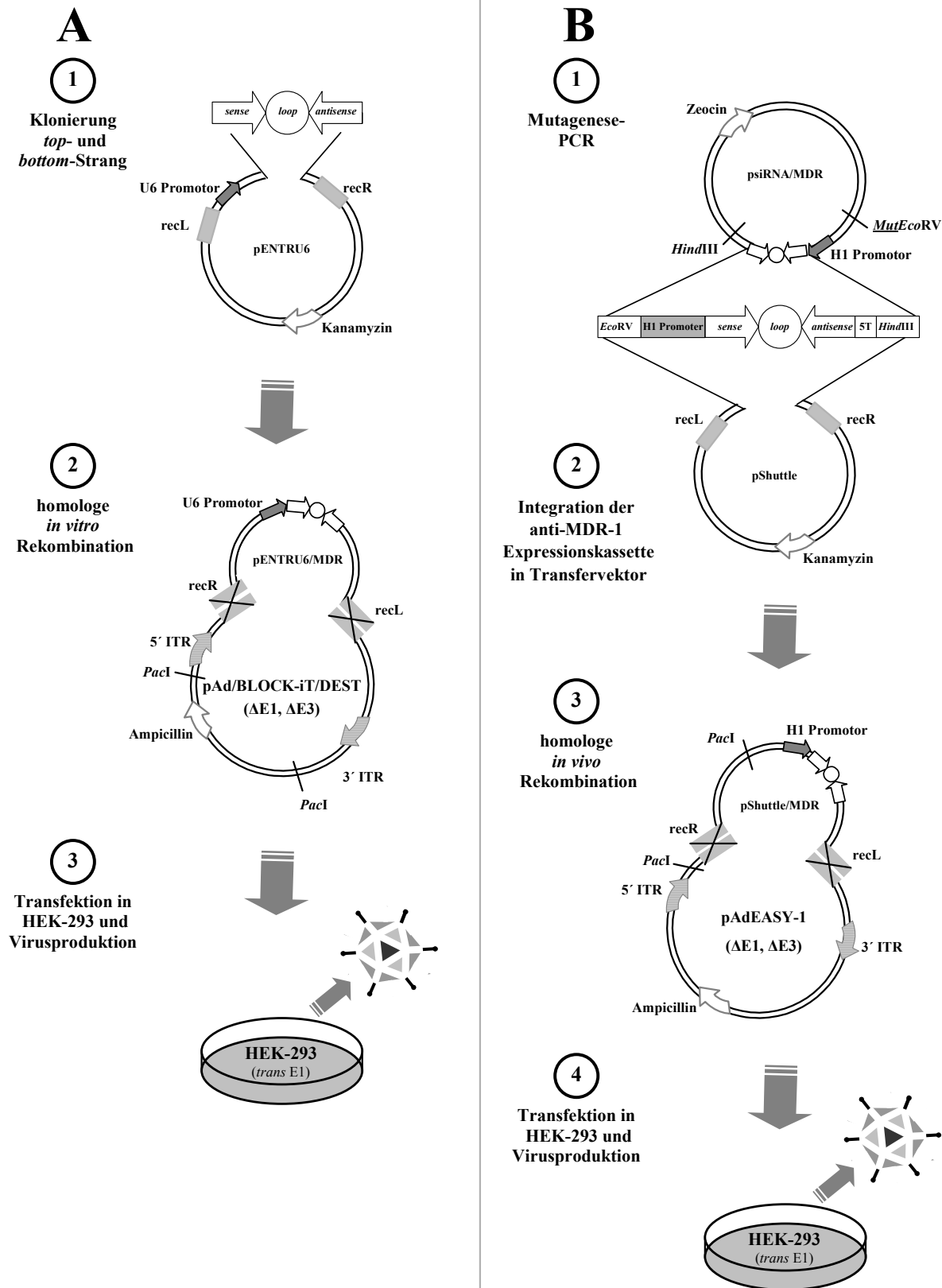


Abb. 7: Produktion rekombinanter Viren

(A) Konstruktionsschritte von Ad5U6/MDR → anti-MDR1-shRNA-Expression unter U6-Promotorkontrolle

(B) Konstruktionsschritte von Ad5H1/MDR → anti-MDR1-shRNA-Expression unter H1-Promotorkontrolle

Adenovirus produzierende HEK-293A-Zellen wurden nach Sichtbarwerden des viral bedingten zytopathischen Effekts (3.5.6) nach 10-11 Tagen abgeschabt, zentrifugiert (15 min, 800 rpm) und in 20 μ M Tris-Base, 25 μ M NaCl, 2,5 % Glycerol bei -80°C gelagert.

3.5.3 Herstellung aufgereinigter hochkonzentrierter Virusstammlösungen

Die wie unter 3.5.2 produzierten rekombinanten Adenoviren wurden durch fünfmaliges Einfrieren in N_2 (-196°C) und Auftauen (37°C) aus den HEK-293A Zellen freigesetzt. Die Zelltrümmer wurden pelletiert (15 min, 3000 rpm) und der virushaltige Überstand über einen CsCl-Gradienten aufgereinigt. Dafür wurden in einem Ultrazentrifugenröhrchen 10 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,45) mit 16 ml CsCl-Lösung (Dichte 1,33) und dem Virusüberstand überschichtet und bei 28000 rpm und 14°C in der LE80K-Ultrazentrifuge 4 h zentrifugiert. Die Adenoviruspartikel mit einer Dichte von 1,34 g/ml sammeln sich in einer scharfen Bande zwischen den CsCl-Schichten.

Unter strikter Beachtung der S2-Sicherheitsvorkehrungen wurde die Adenovirusbande mit einer 18G-Kanüle und 2 ml-Spritze abpunktiert und das gesammelte Volumen in Dialysekassetten gegen sterilfiltriertes 10 mM Tris-HCl (pH 7,6-7,8) dialysiert. Dabei wird das CsCl mit Hilfe einer semipermeablen Membran entfernt. Um ein Ausfällen des CsCl zu vermeiden, erfolgte die erste Dialyse für 2 h bei RT, anschließend bei 4°C wobei das Dialysat insgesamt viermal erneuert wurde. Nach 24-stündiger Dialyse wurde die Virussuspension aus der Dialysekassette abgezogen, aliquotiert und bei -80°C gelagert.

Die erreichbaren Viruskonzentrationen mit dieser Methode liegen in unserem Labor im Bereich von 10^9 bis 10^{11} pfu/ml.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung der Virusstammlösungen

3.5.4.1 Bestimmung der Viruspartikelkonzentration

Diese Methode der Konzentrationsbestimmung beruht auf der photometrischen Messung des DNA-Gehaltes und ist daher ausschließlich für aufgereinigte Virusstammlösungen geeignet.

Zur Bestimmung der Konzentration der Viruspartikel wurde eine 1:10 Verdünnung der Virusstammlösung in 0,1 % SDS in PBS hergestellt und 10 min bei 70°C inkubiert, um eine Freisetzung der viralen DNA aus den Adenoviruspartikeln zu erreichen. Im Anschluss wurde im Photometer die Absorption bei 260 nm Wellenlänge bestimmt. Zur Berechnung der Konzentration der Viruspartikel wird angenommen, dass ein Absorptionswert von 1 einer

Viruspartikelkonzentration von $1,1 \times 10^{12}$ Viruspartikel/ml entspricht (Mittereder *et al.*, 1996). Der errechnete Wert der Viruspartikelkonzentration liegt immer oberhalb der beim Plaque Assay (3.5.4.2) ermittelten Konzentration an *plaque forming units* (pfu), da der Großteil der Viruspartikel nicht funktionell im Sinne der Plaquebildung ist. Bei guten Viruspräparationen beträgt das Verhältnis virale Partikel : pfu $\leq 100 : 1$ (Mittereder *et al.*, 1996). Eine Ergänzung der qualitativen Beurteilung der Virusstammlösung erfolgte durch die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und die Berechnung der Ratio. Ein 260/280 nm Verhältnis zwischen 1,17 und 1,35 bedeutet einen akzeptablen Reinigungsgrad.

3.5.4.2 Bestimmung der Konzentration infektiöser Viruspartikel (Plaque Assay)

Dafür wurde die Eigenschaft von Adenoviren genutzt, in einem HEK-293A-*monolayer* unter einem *Overlay* Plaques zu bilden (Hitt *et al.*, 1995). Zur Adenovirus-Titration wurden 90 % konfluente HEK-293A Zellen mit seriellen Zehnfach-Verdünnungen (10^{-7} - 10^{-10}) der Virusstammlösung in Opti-MEM infiziert (Dreifachbestimmung). Nach 30 min Inkubation bei 37 °C / 5 % CO₂, um eine Adsorption des Virus zu erlauben, wobei alle 10 min zur ausgeglichenen Verteilung ein vorsichtiges Schwenken der Zellkulturplatte erfolgte, wurde mit einem *Overlay* überschichtet. Der *Overlay* besteht aus gleichen Teilen aufgekochter 30 min bei 42 °C abgekühlter 1 %iger *Low Melting Point* Agarose und 2x MEM Earle Medium (siehe unten). Nach dessen Abkühlung und Aushärtung (37 °C) erfolgte die weitere Inkubation unter Standardbedingungen.

Durchschnittlich nach 8 Tagen Inkubation kam es zur Ausbildung von Plaques, die die lytische Aktivität des Virus darstellen. Diese durch Zelllyse entstandenen Löcher im Zellrasen wurden jeweils nach acht und zehn Tagen gezählt und gemittelt. Unter Berücksichtigung der jeweiligen Verdünnung erfolgte die Berechnung der Konzentration infektiöser Viruspartikel mit der Einheit pfu/ml (*plaque forming units/ml*).

2 x MEM Earle Medium (für 100 ml)

1x MEM	76,2 ml
10x MEM	9 ml
NaHCO ₃ 7,5 %	2,5 ml
Amphotericin B	300 µl
Penicillin/Streptomycin	1,5 ml
Glutamin 2 M	1,5 ml
Hefeextrakt 5 %	1,5 ml
Pferdeserum	7,5 ml

3.5.5 Adenovirale Transduktion *multidrug*-resistenter Tumorzellen

Subkonfluente Tumorzellen wurden 16 h nach Aussaat mit adenoviralen Vektoren und verschieden hohen *multiplicities of infection* (MOI) transduziert. Dieser Wert beschreibt die Ratio der Anzahl infektiöser Viruspartikel pro Zielzelle zum Zeitpunkt der Transduktion. Die Transduktion erfolgte in Opti-MEM für 1 h bei 37 °C / 5 % CO₂ und leichter Bewegung alle 15 min. Nach der Transduktion wurde das Adenovirus-Opti-MEM-Gemisch abgenommen und durch entsprechendes Kulturmedium mit 10 % FCS ersetzt.

3.5.6 Darstellung des CPE mittels Kristallviolett-Färbung

Durch den Verlust eines intakten Zytoskeletts kommt es zu einer phänotypischen Veränderung infizierter Zellen, bei welchem sich die Zellen abkugeln. Dieses wird als zytopathischer Effekt (*cytopathic effect*, CPE) bezeichnet (Hitt *et al.*, 1995).

Der Kristallviolett-Assay (Kueng *et al.*, 1989) ist nur bei adhärent wachsenden Zellen anwendbar. Sterben solche Zellen ab, verlieren sie ihre Fähigkeit zur Adhärenz und werden deshalb mit dem initialen Waschschrift (PBS) des Assays entfernt. Alle verbliebenen Zellen werden anschließend unspezifisch mit Kristallviolett (4 % Kristallviolett in 50 % Methanol) angefärbt und nach Elution des Farbstoffs mit 0,1 % SDS in PBS photometrisch ausgewertet (590 nm). Die Stärke der Anfärbung korreliert mit der Anzahl der vitalen, adhären Zellen.

4 ERGEBNISSE

4.1 Etablierung Zervixkarzinomzelllinie mit MDR-Phänotyp

Die Selektion einer gegenüber Zytostatika resistenten Subpopulation von Tumorzellen als auch die Induktion der Überexpression von MDR1/P-gp sind die Hauptfaktoren für den limitierten Erfolg einer Chemotherapie. Für *in vitro* Untersuchungen werden deshalb Tumorzelllinien mit entsprechendem MDR-Phänotyp benötigt. Innerhalb vorliegender Arbeit wurde dafür die adhärent wachsende Zervixkarzinomzelllinie HeLa als Modell ausgewählt. Durch sukzessive Erhöhung der Daunorubicin Konzentration (beginnend mit 0,01 µg/ml bis 0,25 µg/ml) wurde innerhalb des relativ kurzen Zeitraums von vier Monaten die MDR1/P-gp überexprimierende Subzelllinie HeLaRDB etabliert. Die Konzentration wurde durchschnittlich nach vier Tagen um 0,075 µg/ml Daunorubicin gesteigert.

4.1.1 MDR1/P-gp-Expression in HeLaRDB

Wie in Abb. 8A gezeigt, konnte eine starke Aufregulation der MDR1 mRNA Expression mit bereits 0,25 µg/ml Daunorubicin auf das Level der klassisch *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB erzielt werden, die standardisiert 2,5 µg/ml Daunorubicin erhält. Auch auf Proteinebene konnte die MDR1/P-gp Expression der HeLaRDB auf das Niveau der EPG85-257RDB angehoben werden, wobei für die jeweils parentalen Ausgangszelllinien HeLa bzw. EPG85-257P kein MDR1/P-gp spezifisches Signal detektiert wurde (Abb. 8B).

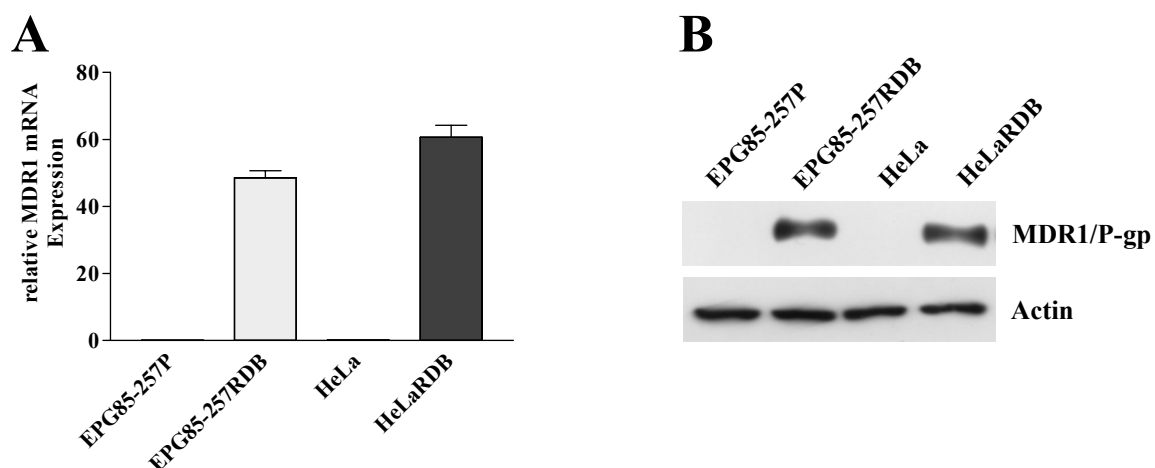


Abb. 8: MDR1/P-gp Genexpressionsanalyse HeLaRDB

(A) Quantifizierung der MDR1 mRNA Expression der parentalen und *multidrug*-resistenten Varianten der Zervixkarzinomzelllinie HeLa und Magenkarzinomzelllinie EPG85-257, normalisiert auf die mRNA Expression des *housekeeping* Gens GAPDH. **(B)** Western Blot Analyse der MDR1/P-gp Proteinexpression.

4.1.2 Kreuzresistenzen der HeLaRDB

Das Phänomen der *Multidrug*-Resistenz (MDR) schließt einen Kreuzresistenz-Phänotyp gegen unterschiedliche, nicht verwandte Antineoplastika ein. Dieser wurde mittels *in vitro* Zytotoxizitätsassays bestimmt. Aus der Exposition der HeLaRDB mit Daunorubicin resultierte im Vergleich zur parentalen Ausgangszelllinie HeLa neben der 430-fachen relativen Resistenz gegenüber Daunorubicin (Abb. 9A) auch eine Resistenzsteigerung gegenüber Vincristin um den Faktor 2560 (Abb. 9B). Deutliche Resistenzsteigerungen gegenüber Etoposid, Paclitaxel und Mitoxantron konnten ebenfalls nachgewiesen werden (Abb. 9C-E). Die entsprechenden Zytostatika-spezifischen IC₅₀-Werte sowie Resistenzfaktoren sind in Tab. 8 zusammengefasst.

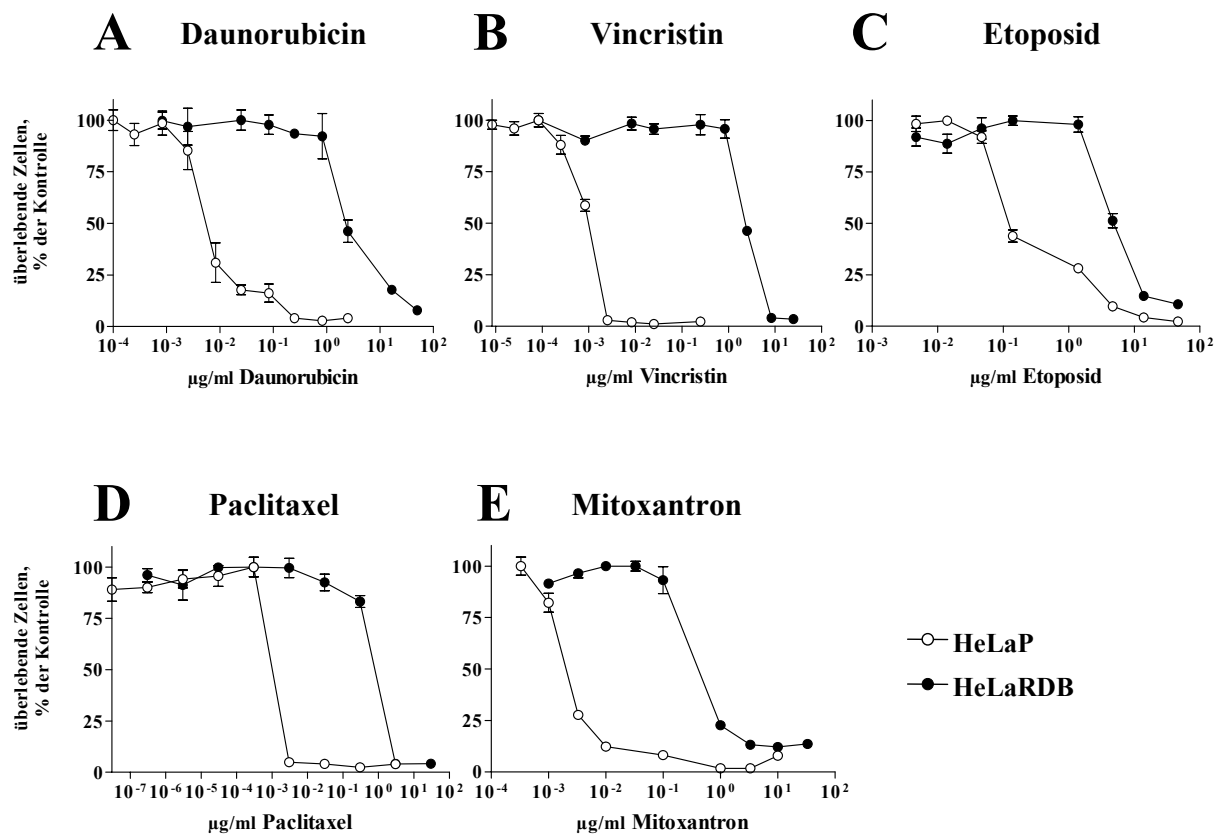


Abb. 9: Kreuzresistenz der HeLaRDB gegenüber strukturell nicht verwandter Zytostatika

Zytotoxizitätsassay mit der Zytostatika-sensitiven Zervixkarzinomzelllinie HeLa und deren *multidrug*-resistenten Sublinie HeLaRDB und Bestimmung ihrer Resistenz gegenüber (A) Daunorubicin, (B) Vincristin, (C) Etoposid, (D) Paclitaxel und (E) Mitoxantron. Die jeweils unbehandelten Zellen wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen. MDR1/P-gp spielt als Mitglied der ABC-Transporterfamilie bei der Eliminierung strukturell nicht verwandter Substanzen eine bedeutende Rolle.

Tab. 8: Kreuzresistenzen der HeLaRDB

	IC ₅₀ [µg/ml] ¹				
Tumorzelllinie	Daunorubicin	Vincristin	Etoposid	Paclitaxel	Mitoxantron
HeLa	0,000749 ± 1,2 ⁻⁰⁵	0,000943 ± 2 ⁻⁰⁵	0,1745 ± 9,9 ⁻⁰³	0,00171 ± 1,1 ⁻⁰³	0,001793 ± 2,9 ⁻⁰³
HeLaRDB	0,3228 ± 0,012	2,414 ± 0,019	4,683 ± 0,122	0,4967 ± 2,2 ⁻⁰³	0,4111 ± 8,9 ⁻⁰³
Resistenzfaktor (x-fach)²	430,9	2559,9	26,8	290,5	229,3

⁽¹⁾ Die IC₅₀-Werte stellen Mittelwerte der Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen dar. ⁽²⁾ Der jeweilige Zytostatika-spezifische Resistenzfaktor der HeLaRDB bezieht sich auf die parentale Zelllinie HeLa.

4.2 CAR-Expression der verwendeten Tumorzellmodelle

Wie einleitend besprochen, ist die Expression des Coxssackie/Adenovirus Rezeptors (CAR) an der Oberfläche der zu transduzierenden Tumorzellen maßgeblich am Erfolg einer adenoviral vermittelten Gentherapie beteiligt. Zu Beginn wurden deshalb die innerhalb dieser Arbeit genutzten Tumorzelllinien auf ihre CAR-Expression untersucht, um sicher zu stellen, dass diese mit Adenoviren infizierbar sind und eine effiziente Transkription der in das adenovirale Genom integrierten anti-MDR1 shRNA Expressionskassetten gewährleistet ist (Abb. 10).

Die CAR-mRNA-Expression der klassisch *multidrug*-resistenten Zelllinie EPG85-257RDB wurde 100 % gesetzt, um eine direkte Vergleichbarkeit mit den anderen Karzinomzelllinien zu ermöglichen. Die *multidrug*-resistenten Varianten der Zelllinien EPG85-257 und HeLa weisen gegenüber ihren parentalen Ausgangszelllinien eine signifikant erhöhte CAR mRNA Expression auf, wobei diese Aufregulation von CAR bei der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB im Vergleich zu den EPG85-257P am stärksten ausgeprägt ist (5-fach, $p < 0,001$).

Die parentale Zervixkarzinomzelllinie HeLa besitzt ein relativ hohes CAR-Expressionslevel und gilt als sehr gut adenoviral transduzierbar (Rein *et al.*, 2004; Goodfellow *et al.*, 2005). Im direkten Vergleich zu den *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB zeigen sie eine nur 25 %ige CAR-mRNA-Expression. Die *multidrug*-resistente Subzelllinie HeLaRDB hat gegenüber den parentalen HeLa ein 2-fach ($p < 0,001$) erhöhtes CAR-mRNA-Expressionslevel.

Die Pankreaskarzinomzelllinien EPP85-181P und EPP85-181RDB weisen nur jeweils 8,5 % der CAR-mRNA Expression der EPG85-257RDB auf. Diese vergleichsweise geringe Expression des Coxssackie/Adenovirus Rezeptors (CAR) in der Zellmembran der EPP85-181RDB kann Auswirkungen auf deren Infizierbarkeit haben, wie später Southern Blot Analysen bestätigen werden (Kapitel 4.5.2).

Dies wird im ersten Schritt durch den später auftretenden zytopathischen Effekt in den Pankreaskarzinomzelllinien unterstützt (nicht gezeigt). Deshalb wurde für Folgeexperimente ein modifiziertes Transduktionsprotokoll (3.5.5) verwendet, in dem die Infektionszeit um 5 h verlängert wurde. Eine gegenüber den EPP85-181P signifikant erhöhte CAR-Expression der *multidrug*-resistenten Subzelllinie EPP85-181RDB wurde nicht detektiert.

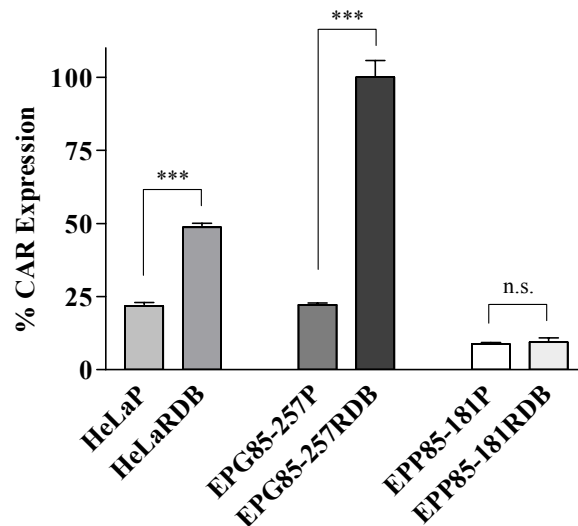


Abb. 10: CAR-mRNA Expression der verwendeten Tumorzelllinien

Quantifizierung der CAR-mRNA Expression der parentalen und *multidrug*-resistenten Varianten der Zervixkarzinomzelllinie HeLa, Magenkarzinomzelllinie EPG85-257 und Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181 normalisiert auf die mRNA Expression des *housekeeping* Gens GAPDH. Die CAR/GAPDH Ratio der EPG85-257RDB wurde 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation berechnet (n.s. = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$)

4.3 Konstruktion von anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenovirusvektoren

Für das Ziel der effizienten endogenen Expression von anti-MDR1 shRNAs in *multidrug*-resistenten Karzinomzelllinien wurden verschiedene rekombinante Adenoviren konstruiert. Diese Konstruktionen sind unter 3.5.1 und 3.5.2 ausführlich erläutert und in Abb. 7 zusammengefasst. Nach der erfolgreichen Produktion und Aufreinigung (3.5.3) wurden alle rekombinanten Adenoviren auf ihre Replikationsinkompetenz ($\Delta E1$) überprüft.

4.3.1 $\Delta E1$ der rekombinanten Adenoviren

Die E1-Deletion verhindert eine eigenständige Adenovirusreplikation und die dadurch bedingte Lyse der transduzierten Tumorzellen; sie kann ausschließlich durch die Zelllinie HEK-293A komplementiert werden (Graham *et al.*, 1977). Die in HEK-293A-Zellen vermehrten infektiösen Adenoviren bleiben demnach in ihrer E1-Region deletiert ($\Delta E1$), dadurch replikationsdefizient, aber infektiös und können die integrierten shRNA-Sequenzen innerhalb von Tumorzellen exprimieren.

Die Bestätigung, dass während der Herstellung anti-MDR1 shRNA-exprimierender Adenoviren keine Kontamination mit replikationskompetenten Revertanten auftrat, erfolgte nach Denaturierung der Adenoviren mittels PCR und Adenovirusgenom-spezifischen Primern (Tab. 2). Als Positivkontrolle wurde genomische DNA des Wildtyp-Adenovirus Subtyp 5 (Ad5/Wt) mitgeführt.

Abb. 11 zeigt dies exemplarisch für das Adenovirus Ad5U6/MDR-C. Neben der E1A-Deletion (1040 bp) wurden zwei E2-Regionen, E2*early* (240 bp) und E2*late* (348 bp) im Vergleich zum Adenovirus Wildtyp kontrolliert und bei den in dieser Arbeit konstruierten Adenoviren zusätzlich die Integration der anti-MDR1 shRNA Expressionskassette nachgewiesen (*Insert*, 340 bp). Mit der Bestätigung, dass allen in dieser Arbeit verwendeten Adenoviren die E1A-Region fehlt, konnte die Replikationsinkompetenz zugesichert werden.

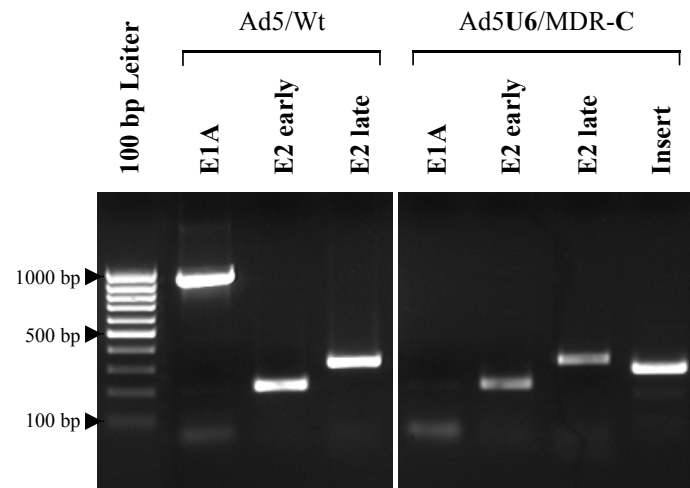


Abb. 11: Nachweis der E1A-Deletion von Ad5U6/MDR-C

PCR mit genomspezifischen Primern für die Regionen E1A, E2_{early}, E2_{late} bzw. Nachweis der integrierten anti-MDR1 shRNA-Expressionskassette, exemplarisch gezeigt für Ad5U6MDR-C (**rechts**) im Vergleich zum Adenovirus Subtyp 5 Wildtyp Ad5/Wt (**links**). Bei Ad5U6/MDR-C fehlt das Amplifikat für E1A. Damit ist das Adenovirus replikationsinkompetent.

4.3.2 Nachweis der prozessierten anti-MDR1 siRNAs

Die zwei humanen *multidrug*-resistenten MDR1/P-gp überexprimierenden Zelllinien EPG85-257RDB (Magenkarzinom) und EPP85-181RDB (Pankreaskarzinom), wurden mit verschiedenen anti-MDR1-shRNA exprimierenden Adenoviren wie unter 3.5.5 beschrieben, transduziert.

Die Expression der im adenoviralen Genom integrierten anti-MDR1 shRNA Kassetten bzw. deren vom *Dicer* intrazellulär prozessierte siRNAs (19 bp) wurde mittels Northern Blot Analyse wie unter 3.2.16 beschrieben, überprüft und ist in Abb. 12 (untere Bande) gezeigt. Die Konstrukte MDR-C und MDR-D unterscheiden sich nur in der Länge des *loops*, haben aber die gleiche Zielsequenz, d.h. die prozessierten siRNAs konnten mit der gleichen *antisense*-Sonde nachgewiesen werden (Tab. 7).

Die humane endogene U6 snRNA (*small nuclear RNA*) ist ein Bestandteil des Ribonukleoprotein-Komplexes, der beim *splicing* von Introns eine wichtige Rolle spielt (Kuhn und Käufer, 2002). Innerhalb dieses Experiments diente der Nachweis der U6 snRNA (Tab. 4) als Beladungskontrolle (Abb. 12, obere Bande).

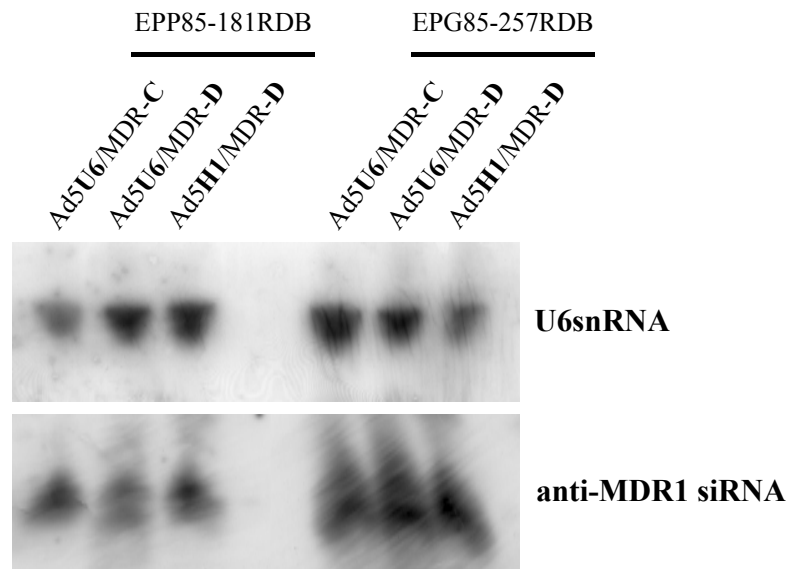


Abb. 12: Nachweis der prozessierten anti-MDR1 siRNAs

Northern Blot Analyse von mit verschiedenen anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren (MOI 5) transduzierten EPP85-181RDB and EPG85-257RDB;

(obere Banden) interne Beladungskontrolle mit U6 snRNA-spezifischem Nukleotid (109 nt);

(untere Banden) anti-MDR1 siRNA spezifische Hybridisierung (19 nt);

(nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

4.4 Inhibition der MDR1/P-gp Expression

Nach erfolgreicher Konstruktion und Bestätigung von replikationsinkompetenten ($\Delta E1$) Adenoviren, die unter der Kontrolle eines **H1**- oder **U6**-Promotors unterschiedliche anti-MDR1 shRNAs transkribieren, wurden diese in zwei Tumorzellsystemen untersucht. Dafür wurden die humane *multidrug*-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB sowie die humane *multidrug*-resistente Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB und deren Zytostatika-sensitiven parentalen Ausgangszelllinien (EPG85-257P bzw. EPP85-181P) als Modelzelllinien ausgewählt. Die Ergebnisse von der adenoviralen Infektion der neu etablierten *multidrug*-resistenten Zervixkarzinomzelllinie HeLaRDB werden aus Gründen der Übersichtlichkeit nicht gezeigt.

4.4.1 Inhibition der MDR1 mRNA Expression

Die MDR1 mRNA Expression der EPG85-257RDB (im folgenden jeweils links dargestellt) und EPP85-181RDB (jeweils rechts dargestellt) wurde zunächst drei Tage nach Infektion mit verschiedenen anti-MDR1 shRNA und zur Spezifitätskontrolle mit einem anti-LacZ shRNA exprimierenden Adenovirus mittels Northern Blot detektiert und ist für einen gemeinsamen Überblick in Abb. 13 zusammengestellt.

Das shRNA Konstrukt MDR-A wurde *downstream* eines **H1**- sowie **U6**-Promotors in das jeweilige adenovirale Genom integriert, um die Effizienz beider Promotoren vergleichen zu können. Abb. 13A und B zeigen MDR1 mRNA-Analysen nach Transduktion mit Ad5**H1**/MDR-A und Ad5**U6**/MDR-A. Es konnte eine progressive Reduktion der MDR1 mRNA Expression mit ansteigender (MOI) in beiden Zellsystemen detektiert werden - mit einer Ausnahme: Ad5**U6**/MDR-A konnte selbst mit einer MOI von 100 nach 3 Tagen keine MDR1 mRNA Repression in EPP85-181RDB erreichen (Abb. 13B, rechts). Allerdings war eine MOI 100 von Ad5**U6**/MDR-A in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB sehr wohl effizient (Abb. 13B, links). Das gleiche Konstrukt, nur gesteuert über einen **H1**-Promotor (Ad**H1**/MDR-A) zeigte seine biologische Aktivität in beiden Tumorzelllinien ab MOI 50 (Abb. 13A).

Die ausgeprägteste MDR1-spezifische Repressionseffizienz in beiden Zellsystemen zeigte Ad5**U6**/MDR-C (Abb. 13C). Bereits MOI 5 von Ad5**U6**/MDR-C reduzierten das MDR1 Transkript nach 3 Tagen wesentlich. Eine gesteigerte Dosierung dieses Virus zeigte keinen stärkeren inhibitorischen Effekt.

Das shRNA Konstrukt MDR-D wurde wie MDR-A ebenfalls *downstream* eines **H1**- sowie **U6**-Promotors in das adenovirale Genom integriert. Abb. 13D zeigt die anti-MDR1 RNAi-Effizienz des adenoviral kodierten shRNA-Konstrukts MDR-D unter Kontrolle des **H1**-Promotors. Ad5**H1**/MDR-D verminderte die Expression der mRNA von MDR1 ebenfalls in beiden Tumorzelllinien, wobei dessen inhibitorische Aktivität in dem Pankreaskarzinommodell EPP85-181RDB ausgeprägter war. Wenn in den EPP85-181RDB bereits MOI 20 ausreichend waren, um das MDR1-Transkript fast vollständig zu reduzieren, mussten EPG85-257RDB mit einer MOI 100 infiziert werden, um ähnliche Repressionseffekte zu erzielen (Abb. 13D). Jedoch reichte die Repressionseffizienz von Ad5**H1**/MDR-D nicht an die von Ad5**U6**/MDR-C heran (Abb. 13C).

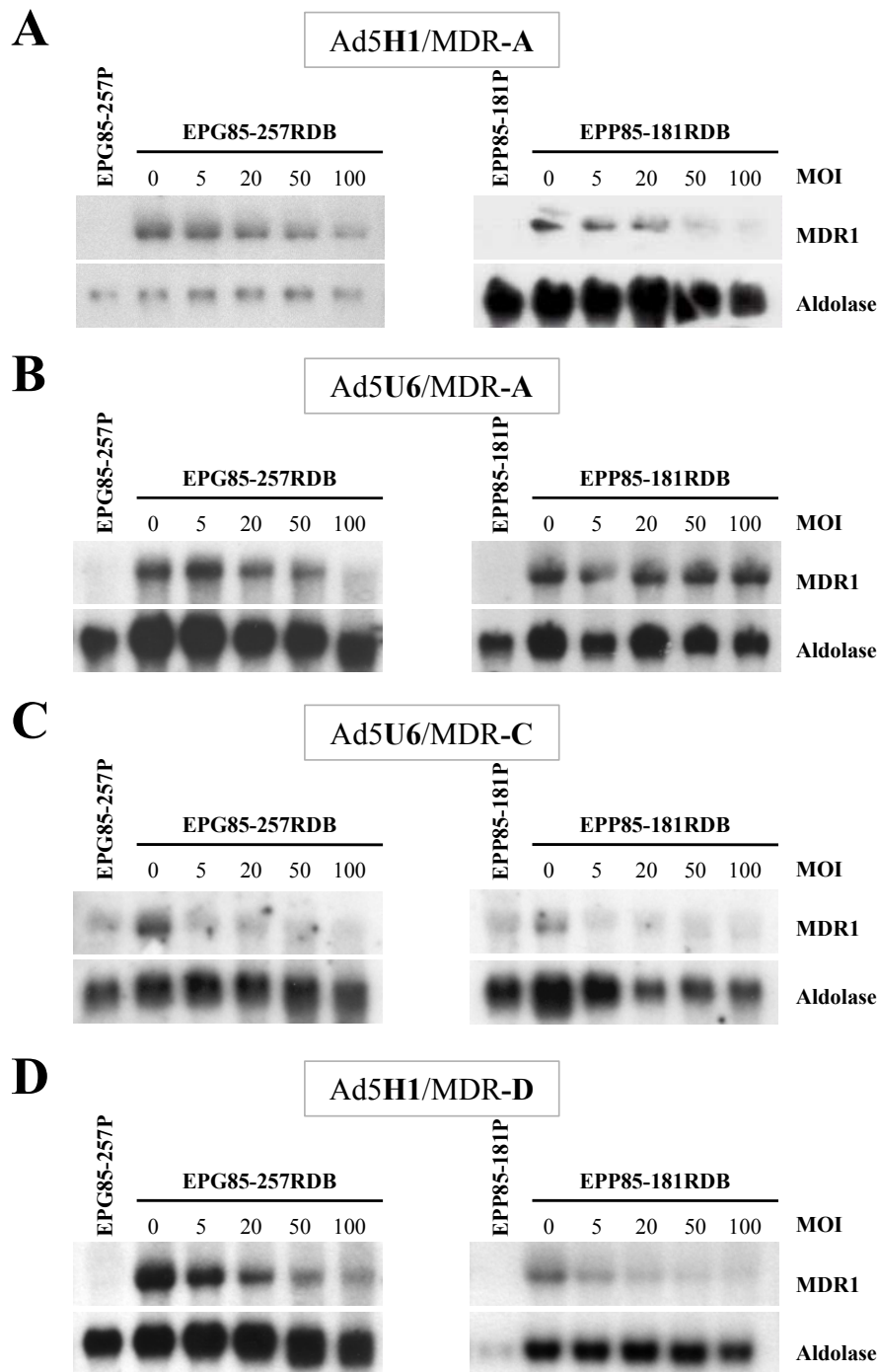


Abb. 13: Inhibition der MDR1 mRNA Expression durch anti-MDR1 shRNA exprimierende Adenoviren

Northern Blot Darstellung der für MDR1/P-gp kodierenden mRNA in humanen *multidrug*-resistenten Magen- und Pankreaskarzinomzelllinien nach Transduktion mit (A) Ad5H1/MDR-A, (B) Ad5U6/MDR-A, (C) Ad5U6/MDR-C und (D) Ad5U6/MDR-D, jeweils 3 Tage Postinfektion. Interne Beladungskontrolle mit Aldolase-spezifischer cDNA. (links) EPG85-257P: Zytostatika-sensitive Magenkarzinomzellen; EPG85-257RDB: *multidrug*-resistente Magenkarzinomzellen; (rechts) EPP85-181P: Zytostatika-sensitive Pankreaskarzinomzellen; EPP85-181RDB: *multidrug*-resistente Pankreaskarzinomzellen (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

Dagegen wurde die MDR1 mRNA Expression vom Kontrolladenovirus Ad5U6/LacZ erwartungsgemäß nicht beeinflusst (Abb. 14). Damit konnte die Selektivität der untersuchten anti-MDR1 shRNA Konstrukte MDR-A, MDR-C und MDR-D bestätigt werden.

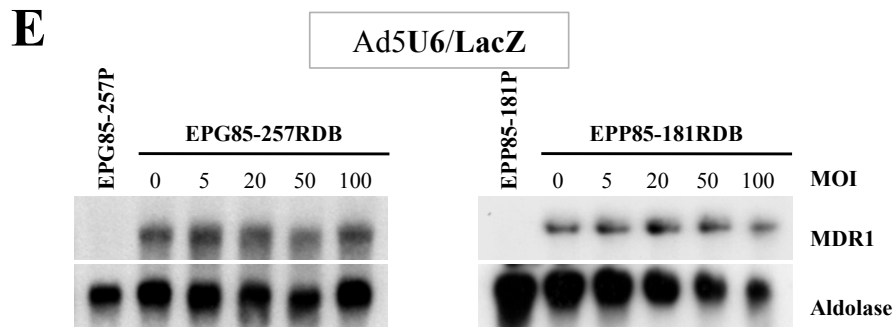


Abb. 14: Keine Inhibition der MDR1 mRNA Expression durch Ad5U6/LacZ

Northern Blot Darstellung der MDR1 mRNA Expression in humanen *multidrug*-resistenten Magen- (**links**) und Pankreaskarzinomzelllinien (**rechts**) 3 Tage nach Transduktion mit Ad5U6/LacZ. Interne Beladungskontrolle mit Aldolase-spezifischer cDNA (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

Da für die Adenoviren Ad5U6/MDR-C und Ad5H1/MDR-D eine hohe Effektivität in Bezug auf die posttranskriptionale Kontrolle von MDR1/P-gp mit weniger als MOI 10 detektiert wurde, konnten auch niedrigere Virusdosen (MOI 0,5 bis MOI 10) analysiert werden. Um die Effizienz von H1- und U6-Promotor zu vergleichen, wurden gleiche Experimente ebenfalls mit Ad5U6/MDR-D durchgeführt. Da bei solch geringen Virusdosen keine zytopathischen Effekte auftreten, wurde nun die MDR1 mRNA Expression erst 5 Tage nach Transduktion untersucht, mit dem Ergebnis, dass sich mit Ad5U6/MDR-C in beiden Zelllinien bereits eine MOI von 1 als ausreichend erwies, um das MDR1 Transkript fast vollständig zu inhibieren (Abb. 15A). Ad5H1/MDR-D, als auch Ad5U6/MDR-D bedingten bereits mit einer *multiplicity of infection* von 2 in beiden Zelllinien einen ausgeprägten MDR1-Repressionseffekt und MOI 10 inhibierten das MDR1 Transkript fast vollständig (Abb. 15B und C). In den EPG85-257RDB war die Effizienz der MDR1-Repression von Ad5U6/MDR-D deutlicher als in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB (Abb. 15C).

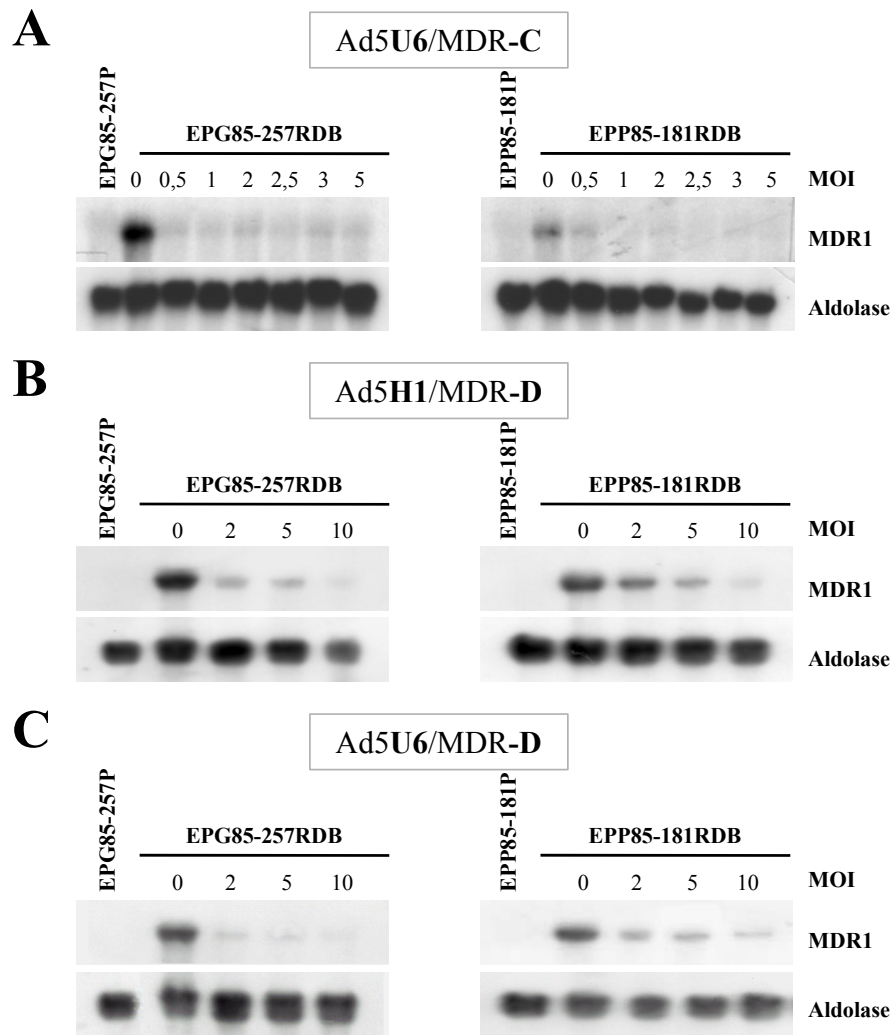


Abb. 15: Inhibition der MDR1 mRNA Expression durch anti-MDR1 shRNA Adenoviren nach 5 Tagen

Northern Blot Darstellung der MDR1/P-gp kodierenden mRNA Expression in humanen *multidrug*-resistenten Magen- (links) und Pankreaskarzinomzelllinien (rechts) 5 Tage nach Transduktion mit **(A)** Ad5U6/MDR-C, **(B)** Ad5H1/MDR-D und **(C)** Ad5U6/MDR-D. Interne Beladungskontrolle mit Aldolase-spezifischer cDNA (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

4.4.2 Inhibition der MDR1/P-gp Protein Expression

Für die Analyse des biologischen Effekts der anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren auf Proteinebene, wurden Western Blot Experimente durchgeführt. Wie die MDR1 mRNA Expressionsanalysen zeigten (4.4.1), haben die shRNA kodierenden Adenoviren eine unterschiedliche biologische Effektivität. Wie dort bereits detektiert, konnte durch Transduktion mittels Ad5U6/MDR-A auch keine signifikante Proteinrepression erreicht werden, weshalb diese Daten nicht gezeigt sind. Auch konnte in den Northern Blot Experimenten kein nennenswerter Unterschied zwischen **H1**- oder **U6**-Promotor kontrollierter anti-MDR1 shRNA Expression festgestellt werden. Western Blot Analysen bestätigten diese Beobachtung (nicht gezeigt).

Deshalb wurden die als hoch effizient getesteten Adenoviren Ad5U6/MDR-C und Ad5H1/MDR1-D auf deren Effekte auf das MDR1/P-gp Proteinlevel im Detail analysiert.

Wie Abb. 16A zeigt, genügten MOI 5, um mit Ad5U6/MDR-C den zellulären Gehalt an MDR1/P-gp nach 3 Tagen in beiden *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien EPG85-257RDB und EPP85-181RDB fast vollständig zu reduzieren. Nach 5 Tagen zeigte sich sogar eine MOI von 1 als ausreichend, um die gleichen Effekte zu erzielen (Abb. 16B). Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit der korrespondierenden mRNA Expression (Abb. 15A).

Wie auch für die Effekte von Ad5H1/MDR1-D auf die MDR1 mRNA Expression erwartet, wurde auch die MDR1/P-gp Proteinsynthese nach 3 Tagen deutlich inhibiert (Abb. 13D), jedoch erst ab einer MOI >5 (Abb. 16C). Dessen anti-MDR1/P-gp RNAi-Effekt auf die Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB zeigte sich im Vergleich zur Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB deutlicher ausgeprägt.

Dagegen hatten Virusdosen bis zu MOI 100 vom Kontrolladenovirus Ad5U6/LacZ keinen biologischen Effekt und beeinflussten die zelluläre MDR1/P-gp Expression nicht (Abb. 16D).

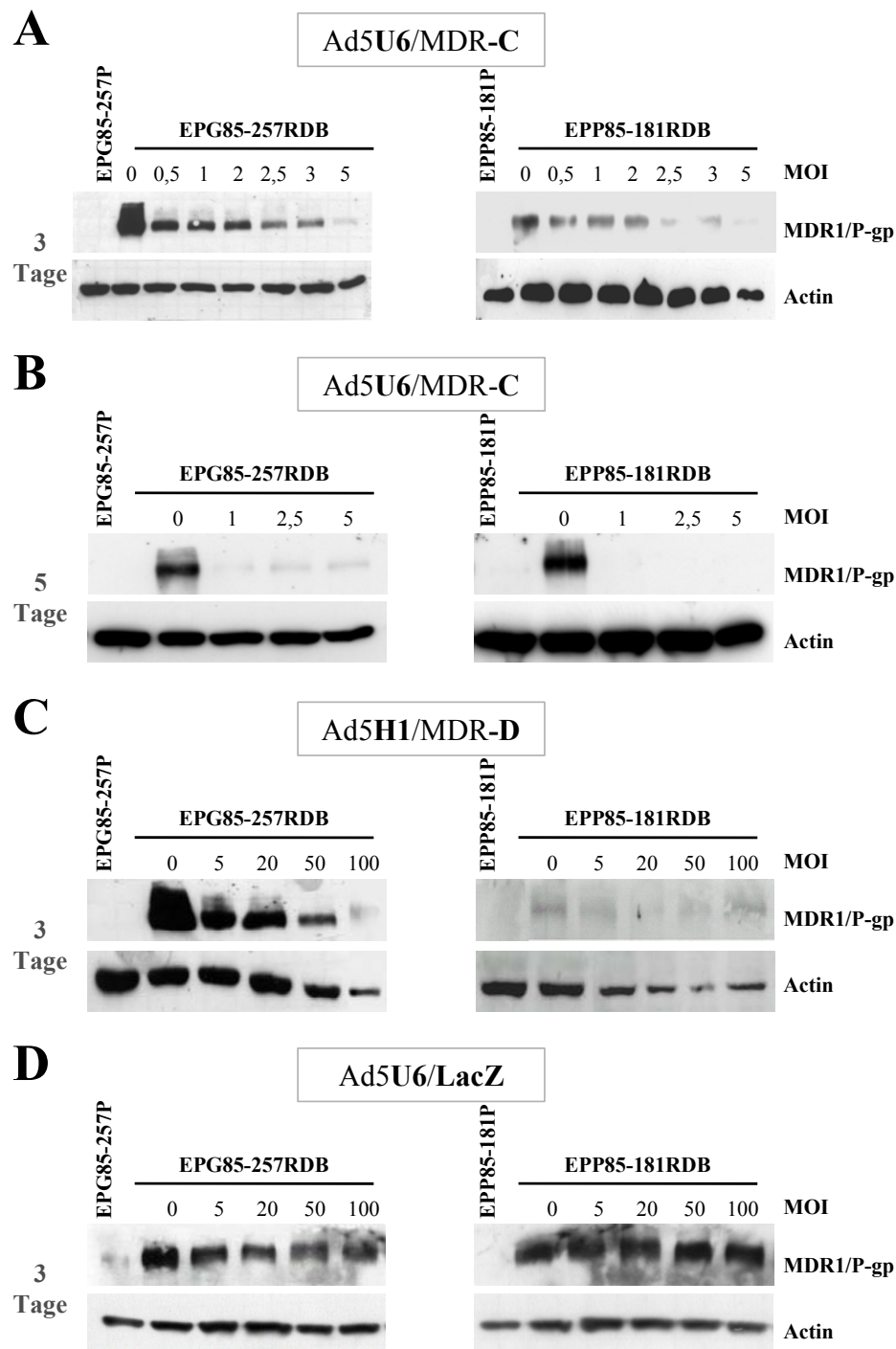


Abb. 16: Inhibition der MDR1/P-gp Protein Expression durch anti-MDR1 shRNA Adenoviren

Western Blot Analyse des zellmembranständigen ABC-Transporters MDR1/P-gp in humanen *multidrug*-resistenten Magen- und Pankreaskarzinomzelllinien nach Transduktion mit (A) Ad5U6/MDR-C 3 Tage Postinfektion sowie (B) 5 Tage Postinfektion bzw. (C) Ad5H1/MDR-D und (D) Ad5U6/LacZ, jeweils 3 Tage Postinfektion. Zur Kontrolle der äquivalenten Proteinbeladung wurden die Western Blot Membranen mit Actin-spezifischem Antikörper inkubiert. (links) EPG85-257P: Zytostatika-sensitive Magenkarzinomzellen; EPG85-257RDB: *multidrug*-resistente Magenkarzinomzellen; (rechts) EPP85-181P: Zytostatika-sensitive Pankreaskarzinomzellen; EPP85-181RDB: *multidrug*-resistente Pankreaskarzinomzellen (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

4.4.3 Steigerung der Akkumulation von Daunorubicin

Die Inhibition des ABC-Transporters MDR1/P-gp sollte in *multidrug*-resistenten Tumorzellen eine erhöhte zelluläre Akkumulation von Daunorubicin bedingen. Deshalb wurden EPG85-257RDB und EPP85-181RDB mittels Durchflusszytometrie (FACS, *Fluorescence Activated Cell Sorting*) drei Tage nach Virusbehandlung analysiert. Zur Auswertung wurde die Daunorubicin-Akkumulation der parentalen Tumorzellen 100 % gesetzt und die Akkumulation der jeweils infizierten *multidrug*-resistenten Tumorzellen relativ dazu berechnet. Auf die MDR1 mRNA und MDR1/P-gp Protein Expressionsanalysen aufbauend, wurde das zelluläre Akkumulationsverhalten nach Infektion mit Ad5U6/MDR-C, Ad5U6/MDR-D und Ad5U6/LacZ vergleichend analysiert.

Wie erwartet, zeigte das Adenovirus Ad5U6/MDR-C auch innerhalb dieses Assays die am stärksten ausgeprägte biologische Aktivität, auch wenn die MDR-Tumorzellen mit sehr geringen Virusdosen behandelt wurden (MOI 1; 2,5; 5; 10 und 20). Abb. 17A zeigt diesbezüglich, dass bereits mit MOI 20 (EPG85-257RDB, $p < 0,001$) bzw. MOI 10 (EPP85-181RDB, $p < 0,001$) die zelluläre Daunorubicin-Akkumulation im Vergleich zur jeweils parentalen Zelllinie vollständig (100 %) wieder hergestellt werden konnte. Damit wurden die vorangegangenen MDR1-Genexpressionsanalysen (Kapitel 4.4.1 und 4.4.2) funktionell bestätigt.

Mit MOI 20 zeigte Ad5U6/MDR-D (Abb. 17B) sehr viel geringere Effekte auf die Akkumulation von Daunorubicin in beiden MDR-Tumorzelllinien - das Daunorubicin-Akkumulationsverhalten wurde durchschnittlich nur um 18 % (EPG85-257RDB, $p < 0,001$) bzw. um 14 % (EPP85-181RDB, $p < 0,01$) gesteigert.

Das Kontrollvirus Ad5U6/LacZ bestätigt auch hier die Spezifität der anti-MDR1 shRNA Konstrukte und beeinflusste die zelluläre Daunorubicin Akkumulation auch mit MOI 20 nicht signifikant (Abb. 17C).

Abschließend sollte die in humanen Tumorzellen mit MDR-Phänotyp mittels adenoviral-RNAi-vermittelter Inhibition des ABC-Transporters MDR1/P-gp verursachte erhöhte zelluläre Akkumulation durch die Steigerung der zellulären Sensitivität gegenüber Daunorubicin und Vincristin bewiesen werden. Beide Zytostatika sind Substrate von MDR1/P-gp.

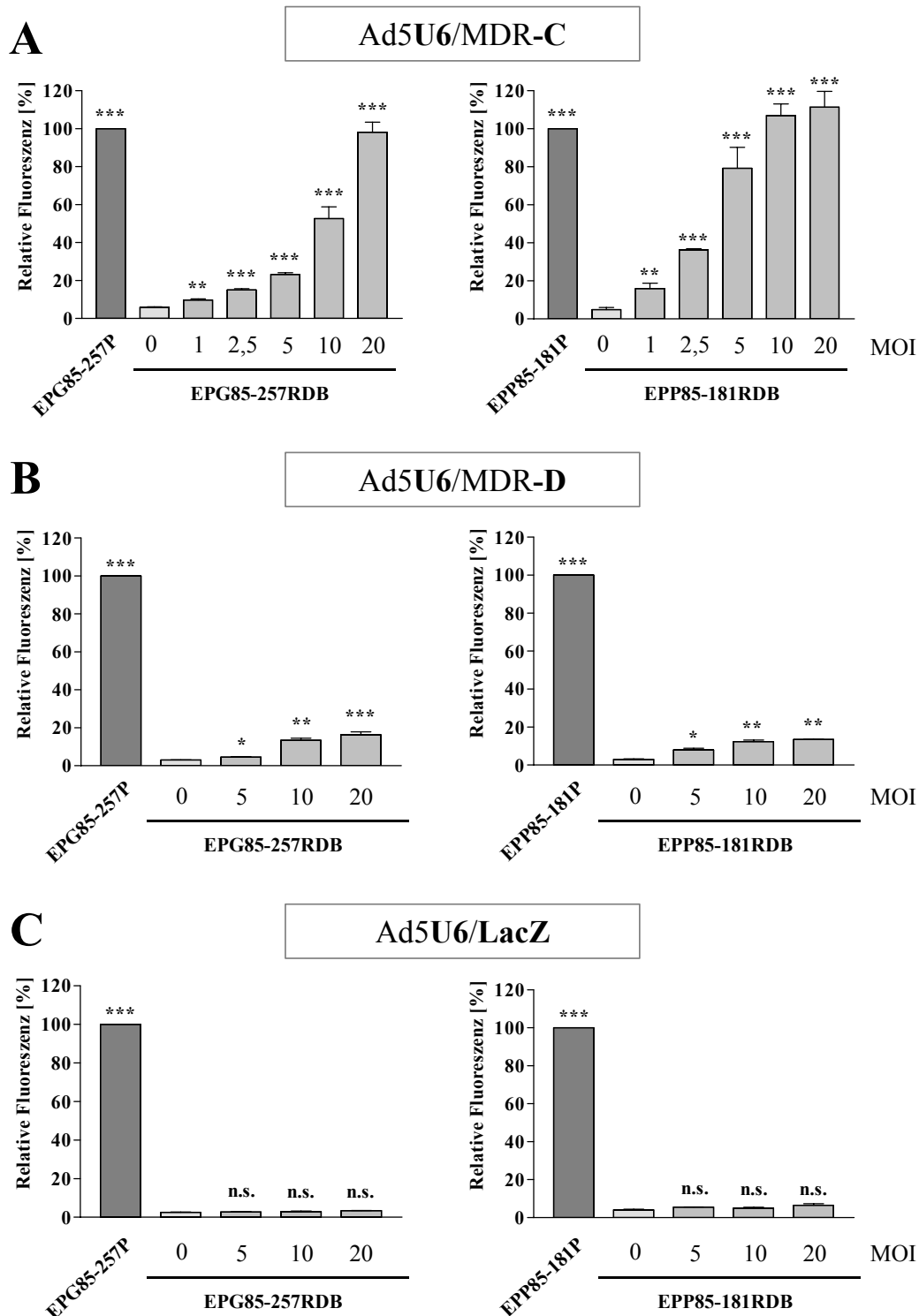


Abb. 17: Daunorubicin Akkumulation, 3 Tage Postinfektion (nach Kaszubiak *et al.*, 2007)

Daunorubicin Akkumulation der *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB (**links**) sowie der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB (**rechts**) und parentalen Pendants EPG85-257P und EPP85-181P 3 Tage nach Transduktion mit (A) Ad5U6/MDR-C, (B) Ad5U6/MDR-D und (C) Ad5U6/LacZ. Die nicht-infizierten parental Tumorzellen wurden jeweils 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation zu diesem Ausgangswert berechnet. Alle Werte sind Mittelwerte mit Standardfehler (SEM) aus drei unabhängigen Versuchen. Signifikanzen wurden mit dem *student's t-test* (zweiseitig) in Bezug auf die jeweilige *multidrug*-resistente Zelllinie berechnet (n.s. = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4.4.4 Reversion des *multidrug-resistant* (MDR)-Phänotyps

Die Aufhebung des MDR-Phänotyps der klassisch *multidrug*-resistenten Zelllinien EPG85-257RDB und EPP85-181RDB durch die Behandlung mit anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren wurde durch den Vergleich der korrespondierenden IC₅₀-Werte von Daunorubicin, Vincristin und Cisplatin mittels Zytotoxizitätsassays ermittelt.

4.4.4.1 Zytotoxizität der infizierten Tumorzellen gegenüber Daunorubicin

Auf die vorangegangenen Daunorubicin-Akkumulationsassays (4.4.3) aufbauend, wurde die Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB jeweils mit MOI 10 des hoch effizienten Adenovirus Ad5U6/MDR-C bzw. zur Kontrolle der Spezifität der anti-MDR1 shRNA mittels Ad5U6/LacZ transduziert. Durch diese Dosis konnte der Daunorubicin-resistente Phänotyp dieser Zelllinie im Vergleich zum parentalen Pendant EPG85-257P zu 65,7 % ($p < 0,001$) aufgehoben werden (Abb. 18A und siehe Resistenzfaktoren in Tab. 9).

Die *multidrug*-resistente Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB wurde jeweils nur mit MOI 5 transduziert, da die Effekte von Ad5U6/MDR-C in dieser Tumorzelllinie stärker ausgeprägt waren (siehe Akkumulationsassay, Abb. 17A). In diesem MDR Tumorzellmodell konnte der Daunorubicin-sensitive Phänotyp zu 87,4 % ($p < 0,001$) wiederhergestellt werden (Abb. 18B, Tab. 9).

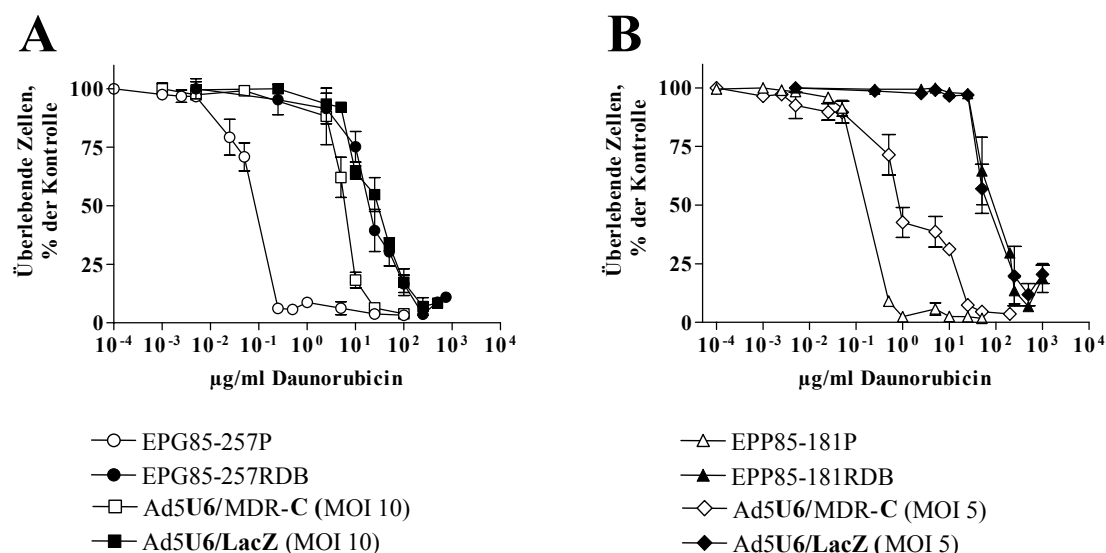


Abb. 18: Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-C und Daunorubicin

Reversion der Daunorubicinresistenz durch das anti-MDR1 shRNA exprimierende Adenovirus Ad5U6/MDR-C, ermittelt über Zytotoxizitätsassays und Bestimmung von IC₅₀-Werten. **(A)** EPG85-257RDB bzw. **(B)** EPP85-181RDB, jeweils transduziert mit **(A)** MOI 10 bzw. **(B)** MOI 5 von Ad5U6/MDR-C und Ad5U6/LacZ (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

Die FACS-Messungen nach Behandlung mit Ad5U6/MDR-D veranschaulichten die geringe Effizienz dieses Virus, die zelluläre Daunorubicin-Akkumulation durch Inhibition des ABC-Transporters MDR1/P-gp zu steigern und können mit den Zytotoxizitätsassays bestätigt werden: wie Abb. 19 zeigt, wurde mit Ad5U6/MDR-D (MOI 10) weder in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB, noch in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB eine signifikante Resensitivierung gegenüber Daunorubicin erzielt. Ad5U6/LacZ hatte erwartungsgemäß ebenfalls keinen Einfluss.

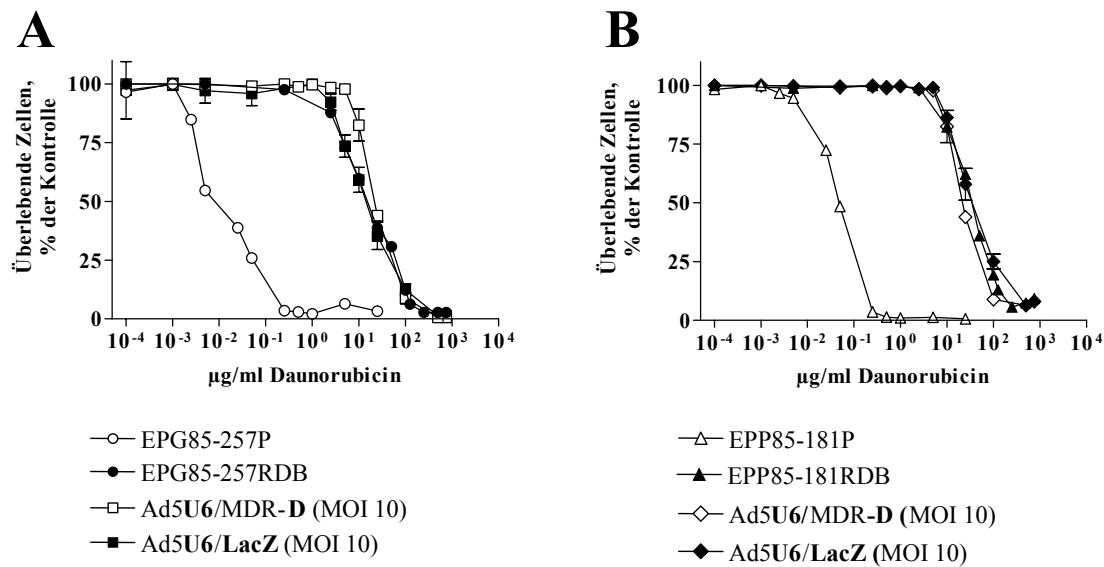


Abb. 19: Keine Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-D und Daunorubicin

Zytotoxizitätsassays durch Behandlung von (A) EPG85-257RDB und (B) EPP85-181RDB mit dem anti-MDR-D shRNA exprimierenden Adenovirus Ad5U6/MDR-D sowie Ad5U6/LacZ und aufsteigenden Konzentrationen von Daunorubicin und Bestimmung von IC₅₀-Werten (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

4.4.4.2 Zytotoxizität der infizierten Tumorzellen gegenüber Vincristin

Der MDR-Phänotyp schließt eine Kreuzresistenz u.a. gegen Vinca-Alkaloide ein, was in diesem Fall bedeutet, dass auch Vincristin von MDR1/P-gp transportiert werden kann. Um die Effizienz des anti-MDR-C shRNA exprimierenden Adenovirus Ad5U6/MDR-C auch mit diesem Zytostatikum nachzuweisen, wurden die Vincristin-IC₅₀-Werte der EPG85-257P, EPG85-257RDB sowie EPP85-181P und EPP85-181RDB mittels Zytotoxizitätsassays bestimmt und mit Kontrollinfektionen (Ad5U6/LacZ) verglichen.

Wie Abb. 20A und B sowie die Berechnungen der Vincristin-spezifischen IC₅₀-Werte und Resistenzfaktoren (Tab. 9) zeigen, konnte der Vincristin-resistente Phänotyp der EPG85-257RDB mittels Ad5U6/MDR-C (MOI 10) zu 81,7 % ($p < 0,001$) und der der EPP85-181RDB zu 96,3 % ($p < 0,001$) aufgehoben werden.

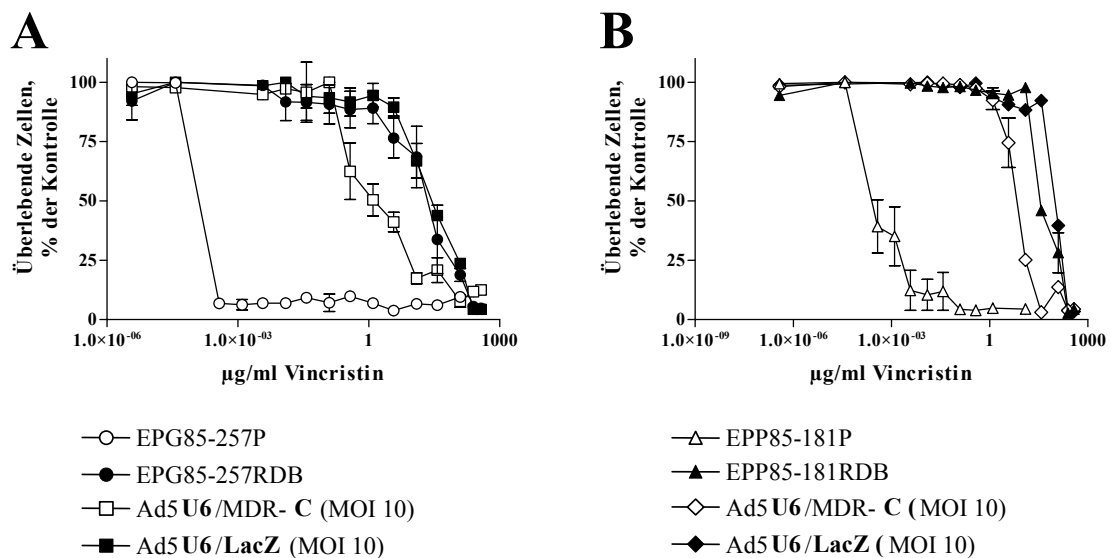


Abb. 20: Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-C und Vincristin

Reversion der Vincristinresistenz durch das anti-MDR1 shRNA exprimierende Adenovirus Ad5U6/MDR-C im Vergleich zum anti-lacZ shRNA exprimierenden Kontrolladenovirus Ad5U6/LacZ, ermittelt über Zytotoxizitätsassays und Bestimmung von IC₅₀-Werten. **(A)** *Multidrug*-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB transduziert mit jeweils MOI 10. **(B)** *Multidrug*-resistente Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB transduziert mit jeweils MOI 10 (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

4.4.4.3 Bestätigung der Spezifität von Ad5U6/MDR-C am Beispiel von Cisplatin

Die Expression von MDR1/P-gp steht nicht im Zusammenhang mit einer Cisplatinresistenz (Lincke *et al.*, 1990; Minemura *et al.*, 1999). Cisplatin wird hauptsächlich durch den ABC-Transporter MRP2 (ABCC2, cMOAT) transportiert (Taniguchi *et al.*, 1996 ; Koike *et al.*, 1997; Kawabe *et al.*, 1999; Materna *et al.*, 2005), der von beiden untersuchten Tumorzelllinien EPG85-257RDB und EPP85-181RDB nicht exprimiert wird.

Deshalb konnte das anti-MDR1 shRNA exprimierende Adenovirus Ad5U6/MDR-C keine Cisplatin-Sensitivitätssteigerung bewirken. Als Kontrolle wurde auch hier das anti-LacZ shRNA exprimierende Adenovirus Ad5U6/LacZ (MOI 10) verwendet.

Die Ergebnisse dieser Cisplatin-Zytotoxizitätsassays sind in Abb. 21A und B graphisch dargestellt, die entsprechenden Cisplatin-spezifischen IC₅₀-Werte sind zusammen mit den Daunorubicin- und Vincristin-IC₅₀-Werten in Tab. 9 zusammengefasst.

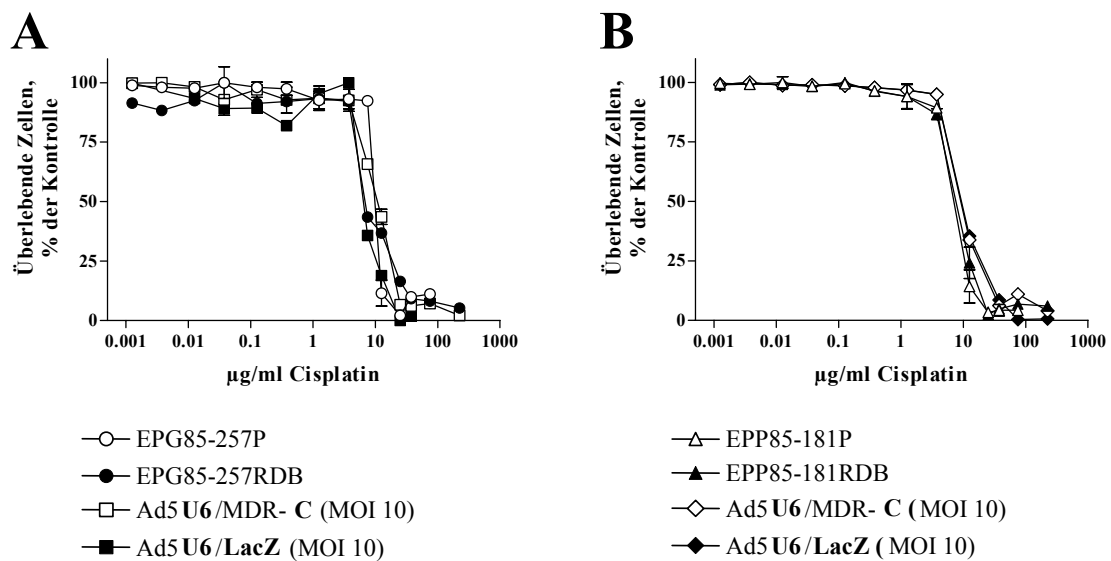


Abb. 21: Zytotoxizitätsassay mit Ad5U6/MDR-C bzw. Ad5U6/LacZ und Cisplatin

Darstellung der Sensitivität gegenüber Cisplatin, ermittelt über Zytotoxizitätsassays und Bestimmung von IC₅₀-Werten. **(A)** Multidrug-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB transduziert mit jeweils MOI 10. **(B)** Multidrug-resistente Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB transduziert mit jeweils MOI 10. Beide Adenoviren beeinflussen die Sensitivität gegenüber Cisplatin nicht (nach Kaszubiak *et al.*, 2007).

Tab. 9: Reversion des MDR-Phänotyps durch Ad5U6/MDR-C

Tumorzelllinie	Adenovirus	IC₅₀ [µg/ml]¹ <u>Daunorubicin</u>	Resistenzfaktor (x-fach)²
EPG85-257P	/	0,056 ± 0,089	1,0
EPG85-257RDB	/	14,32 ± 25,30	255,71
EPG85-257RDB	Ad5U6/MDR-C (MOI 10)	4,912 ± 6,673	87,71
EPG85-257RDB	Ad5U6/LacZ (MOI 10)	16,42 ± 32,34	293,21
EPP85-181P	/	0,126 ± 0,174	1,0
EPP85-181RDB	/	45,76 ± 65,52	363,17
EPP85-181RDB	Ad5U6/MDR-C (MOI 5)	5,767 ± 0,712	45,77
EPP85-181RDB	Ad5U6/LacZ (MOI 5)	45,09 ± 54,34	357,85
Tumorzelllinie	Adenovirus	IC₅₀ [µg/ml]¹ <u>Vincristin</u>	Resistenzfaktor (x-fach)²
EPG85-257P	/	0,0002824 ± 0,000041	1,0
EPG85-257RDB	/	34,10 ± 4,735	120.750,71
EPG85-257RDB	Ad5U6/MDR-C (MOI 10)	6,224 ± 1,09	22.039,66
EPG85-257RDB	Ad5U6/LacZ (MOI 10)	31,94 ± 8,275	113.101,98
EPP85-181P	/	0,0000848 ± 0,000011	1,0
EPP85-181RDB	/	28,50 ± 0,5134	336.084,91
EPP85-181RDB	Ad5U6/MDR-C (MOI 10)	1,047 ± 0,2571	12.346,89
EPP85-181RDB	Ad5U6/LacZ (MOI 10)	35,81 ± 2,71	422.287,74
Tumorzelllinie	Adenovirus	IC₅₀ [µg/ml]¹ <u>Cisplatin</u>	Resistenzfaktor (x-fach)²
EPG85-257P	/	9,462 ± 1,2555	1,0
EPG85-257RDB	/	8,603 ± 1,421	0,91
EPG85-257RDB	Ad5U6/MDR-C (MOI 10)	11,02 ± 1,403	1,16
EPG85-257RDB	Ad5U6/LacZ (MOI 10)	6,873 ± 1,7315	0,73
EPP85-181P	/	7,004 ± 1,021	1,0
EPP85-181RDB	/	7,629 ± 0,951	1,09
EPP85-181RDB	Ad5U6/MDR-C (MOI 10)	9,609 ± 0,519	1,37
EPP85-181RDB	Ad5U6/LacZ (MOI 10)	10,10 ± 0,9045	1,44

⁽¹⁾ Die IC₅₀-Werte stellen Mittelwerte der Standardabweichungen aus mindestens drei unabhängigen Versuchen mit dem entsprechenden Zytostatikum dar.

⁽²⁾ Die Resistenzfaktoren beziehen sich jeweils auf die parentale Zelllinie EPG85-257P bzw. EPP85-181P.

(nach Kaszubiak *et al.*, 2007)

4.5 Replikation von Δ E1-Adenoviren in MDR-Tumorzellen

4.5.1 Darstellung des CPE mittels Kristallviolettffärbung

Die humane Zervixkarzinomzelllinie HeLa sowie die innerhalb dieser Arbeit neu etablierte *multidrug*-resistente, MDR1/P-gp überexprimierende Variante HeLaRDB wurden mit dem anti-MDR1 shRNA kodierenden Adenovirus Ad5U6/MDR-C und unterschiedlichen *multiplicities of infection* (MOI 5, 20, 50, 100 und 200) transduziert. Ad5U6/MDR-C ist in seiner E1-Region deletiert und kann damit nicht replizieren. Die Darstellung des zytopathischen Effekts (CPE) mittels Kristallviolettffärbung und deren Quantifizierung (3.5.6) wurden am 7. Tag nach der Transduktion vorgenommen, da der adenovirale Lebenszyklus ca. 3 Tage beansprucht.

Abb. 22A zeigt den CPE der parentalen Zervixkarzinomzelllinie HeLa sieben Tage nach adenoviraler Transduktion. Eine progressive Reduktion der Zellzahl mit ansteigender MOI konnte nicht detektiert werden. Selbst die höchste Virusdosis (MOI 200) erzielte nach sieben Tagen nur marginale zytopathische Effekte ($p < 0,1$), d.h. parentale HeLa-Zellen unterstützen die Replikation des E1-deletierten Adenovirus nicht.

Wurde mit gleichem Virus die *multidrug*-resistente HeLa-Subzelllinie HeLaRDB transduziert, zeigte sich dessen biologische Aktivität bereits ab MOI 20 (Abb. 22B). Der am deutlichsten ausgeprägte Unterschied des CPE zwischen beiden HeLa-Varianten zeigte sich freilich bei einer MOI von 200. Wohingegen bei den HeLa noch 78 % der Zellen adhärent blieben, konnte wegen der mutmaßlich starken Replikation des Virus in den HeLaRDB nur noch 25 % der Zellen überleben, während sich 75 % der Zellen aufgrund ihrer Adenovirusproduktion abkugelten (3.5.6) und somit nicht angefärbt werden konnten.

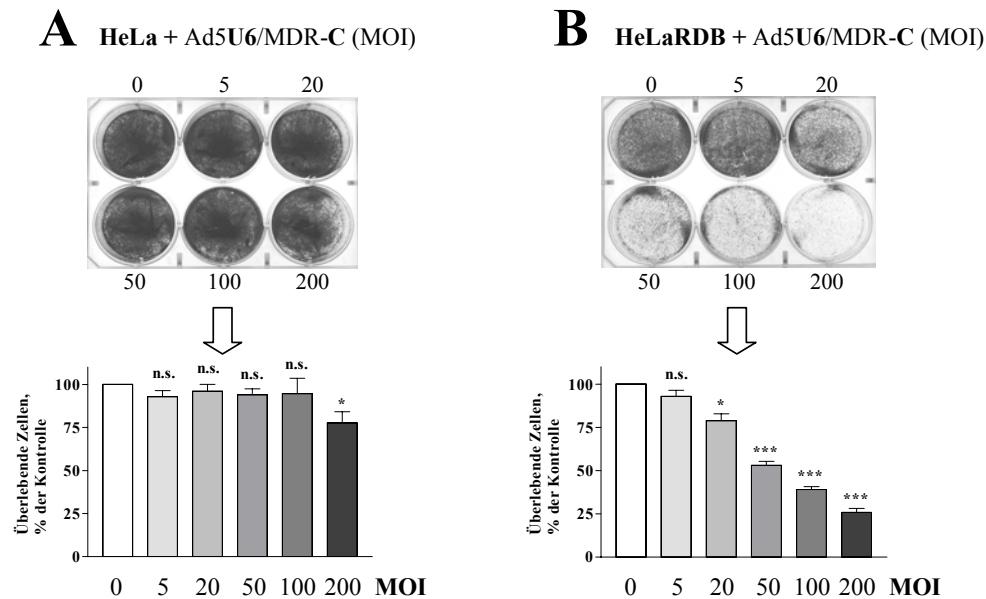


Abb. 22: Zytopathischer Effekt (CPE) nach Transduktion mit AdU6/MDR-C

(A) Darstellung des CPE nach Infektion der parentalen Zervixkarzinomzelllinie HeLa mit dem $\Delta E1$ Adenovirus Ad5U6/MDR-C nach sieben Tagen mittels Kristallviolett färbung im 6-well und dessen Quantifizierung.

(B) Darstellung des CPE nach Infektion der *multidrug*-resistenten Zervixkarzinomzelllinie HeLaRDB mit Ad5U6/MDR-C nach sieben Tagen mittels Kristallviolett färbung im 6-well und dessen Quantifizierung.

Die Kristallviolett färbungen der jeweils nicht infizierten HeLa **(A)** bzw. HeLaRDB **(B)** wurden 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation berechnet (n.s. = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; *** = $p < 0,001$).

Der Umstand, dass eigentlich replikationsdefiziente ($\Delta E1$) Adenoviren in *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien einen MOI-abhängigen stark ausgeprägten zytopathischen Effekt verursachen, gilt nicht nur für HeLaRDB, sondern ebenfalls für beide innerhalb dieser Arbeit untersuchten, *multidrug*-resistenten Varianten der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257 (EPG85-257RDB) und Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181 (EPP85-181RDB), (Daten nicht gezeigt).

Ob sich der zytopathische Effekt (CPE) wirklich auf die spezifisch in *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien stattfindende Adenovirusreplikation begründet, sollten nachfolgende Experimente beweisen.

4.5.2 Darstellung der Adenovirus DNA-Replikation

Drei Tage nach Transduktion (MOI 50) und damit nach einem vollständigen adenoviralen Replikationszyklus wurde genomische DNA aus den Tumorzellen und damit anteilig adenovirale DNA isoliert.

Abb. 23 zeigt eine Southern Blot Analyse (3.2.13), in der ein 3646 nt langes *KpnI* DNA Fragment des adenoviralen E2A-Gens (*E2Alate*) detektiert wurde, womit eine effiziente DNA-Replikation aller innerhalb dieser Arbeit konstruierten Adenoviren nachgewiesen werden konnte. Als Positivkontrolle wurden die parentale Zervixkarzinomzelllinie HeLa und die gastrointestinalen *multidrug*-resistenten EPP85-181RDB und EPG85-257RDB auch jeweils mit dem replikationskompetenten Wildtyp-Adenovirus (Ad5/Wt) infiziert. Der Wildtyp konnte erwartungsgemäß in allen Zellmodellen replizieren, E1-deletierte Adenoviren laut Abb. 23 ausschließlich in Tumorzellen mit MDR-Phänotyp.

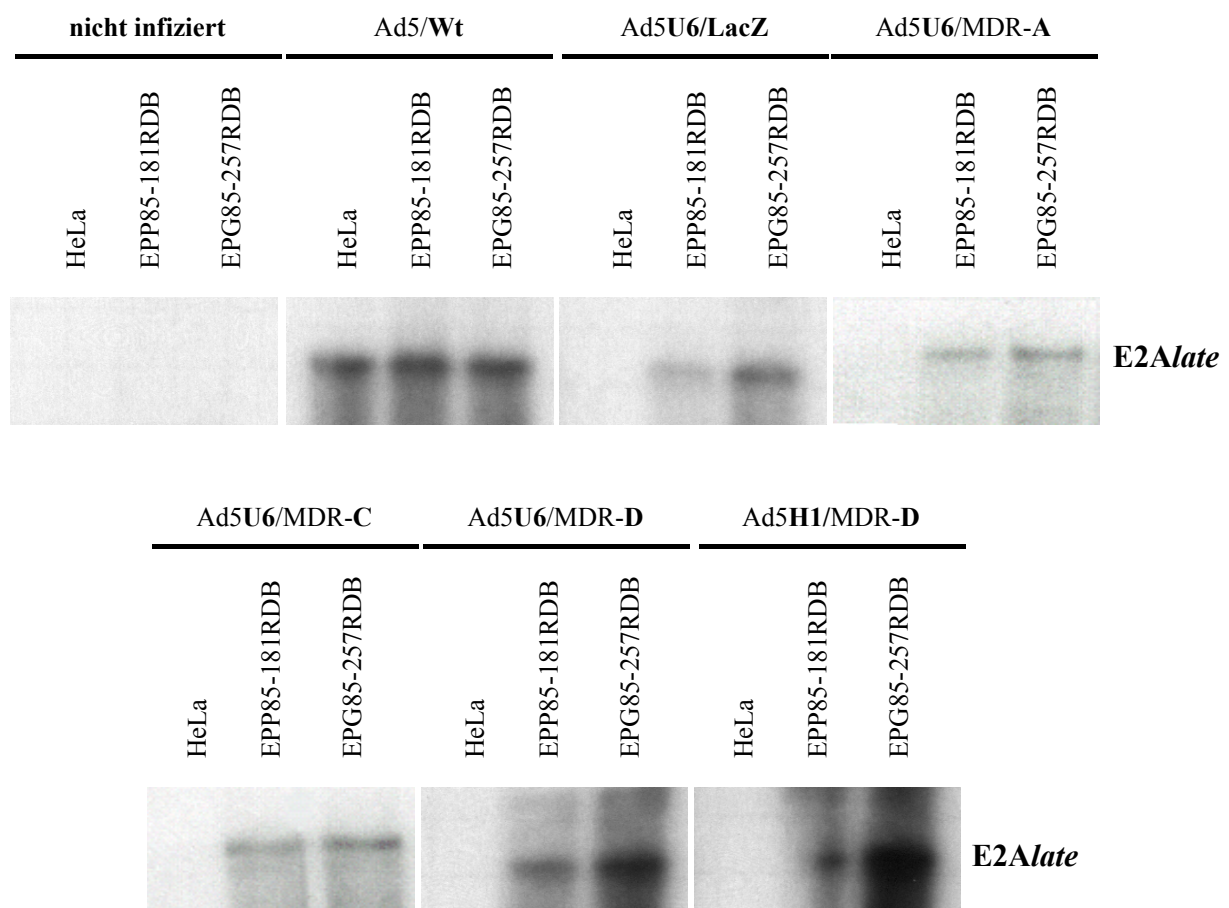


Abb. 23: EPP85-181RDB und EPG85-257RDB unterstützen adenovirale DNA-Replikation

Southern Blot Analyse genomischer DNA aus HeLa, EPP85-181RDB und EPG85-257RDB drei Tage nach Transduktion mit allen innerhalb dieser Arbeit konstruierten E1-deletierten und damit replikationsinkompetenten Adenoviren (jeweils MOI 50). Nachweis der Replikation über die Genregion *E2Alate*.

Alle innerhalb dieser Arbeit genutzten $\Delta E1$ -Adenoviren verursachten nur in den *multidrug*-resistenten EPP85-181RDB und EPG85-257RDB einen deutlichen zytopathischen Effekt, bei den parentalen HeLa-Zellen trat dieser nicht auf. Abb. 23 unterstützt diesen Befund und indiziert zusätzlich eine effiziente DNA Replikation jedes $\Delta E1$ -Adenovirus' in EPP85-181RDB und EPG85-257RDB, in gleicher Effizienz wie das Wildtyp-Adenovirus auch in den parentalen HeLa-Zellen replizieren kann. Dabei können die E1-deletierten Adenoviren in Zytostatika-sensitiven HeLa-Zellen nicht replizieren.

4.5.3 Hydroxyurea verringert adenovirale DNA-Replikation

Eine Möglichkeit die adenovirale Replikation in *multidrug*-resistenten Tumorzellen zu unterbinden, um dadurch bedingte Nebeneffekte bei einer Gentherapie zu eliminieren, ist die Behandlung mit antiviral aktiven Stoffen wie Hydroxyurea (HU). Die ausgewählte Konzentration von HU (5 mM) bedingt eine Zellzyklusblockade, ohne jedoch ein Absterben der anschließend infizierten Tumorzellen zu bewirken. Hydroxyurea ist kein Substrat von MDR1/P-gp und wird deshalb von *multidrug*-resistenten Tumorzellen nicht ausgeschleust (Wu *et al.*, 2003). Ob die adenovirale DNA-Replikation nach Zugabe von HU reduziert werden kann und ob sich die gehemmte virale Replikation auf die adenoviral vermittelte anti-MDR1 shRNA Expression auswirkt, ist Gegenstand folgender Ergebnisse.

Abb. 24 zeigt Southern Blot Analysen, die ein 3646 nt langes *KpnI* DNA Fragment des adenoviralen E2A-Gens detektieren und damit eine effiziente DNA-Replikation aller innerhalb dieser Arbeit konstruierten Adenoviren (Abb. 24B-F) beweist. Wie hier gezeigt, kann die adenovirale DNA-Replikation durch die Zugabe von 5 mM Hydroxyurea stark gehemmt werden. Die mit E1-deletierten Adenoviren transduzierten und anschließend mit Hydroxyurea behandelten *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien HeLaRDB, EPP85-181RDB und EPG85-257RDB reduzieren die adenovirale Replikation signifikant.

Selbst das Wildtyp-Adenovirus (Ad5/**Wt**) kann in seiner extrem starken Replikationseffizienz mittels Hydroxyurea-Behandlung teilweise eingeschränkt werden (Abb. 24A).

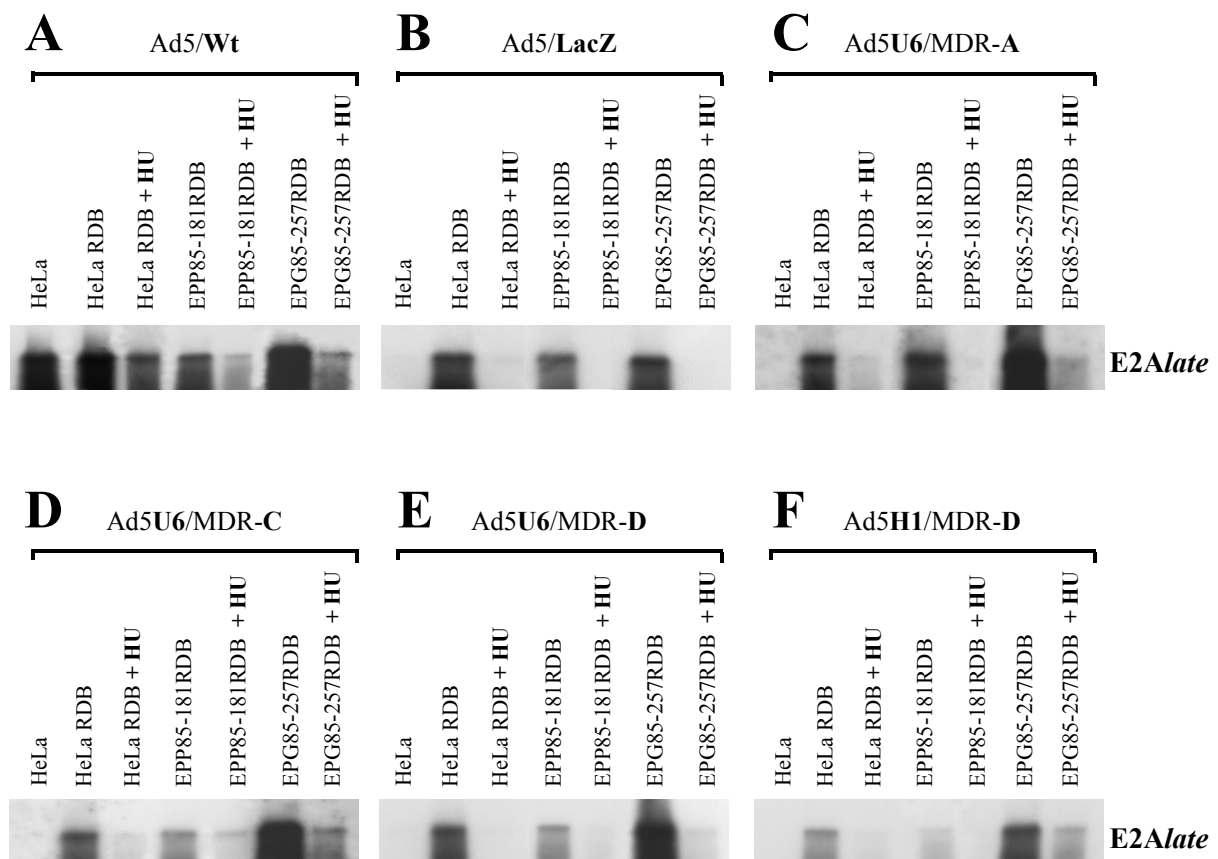


Abb. 24: 5 mM Hydroxyurea (HU) verringert adenovirale DNA-Replikation

Southern Blot Analyse genomischer DNA aus HeLa, HeLaRDB, EPG85-257RDB und EPP85-181RDB 3 Tage nach Transduktion (jeweils MOI 50) mit (A) Wildtyp Adenovirus sowie den Δ E1 Adenoviren (B) Ad5U6/LacZ, (C) Ad5U6/MDR-A, (D) Ad5U6/MDR-C, (E) Ad5U6/MDR-D und (F) Ad5H1/MDR-D. Die radioaktiv markierte E2Alate Sonde hybridisiert mit einem 3646 nt langen *KpnI* DNA Fragment des adenoviralen Gens E2A. Dies indiziert eine effiziente DNA Replikation jedes Adenovirus in HeLaRDB, EPG85-257RDB sowie EPP85-181RDB, in gleicher Effizienz wie das Wildtyp-Adenovirus in HeLa-Zellen replizieren kann. Dagegen unterstützen HeLa-Zellen keine DNA-Replikation E1-deletierter Adenoviren. 5 mM Hydroxyurea unterdrücken die Adenovirusreplikation in allen *multidrug*-resistenten Tumorzellen signifikant.

Aufbauend auf die Southern Blot Analysen (Abb. 23 und Abb. 24), wurde anschließend bestimmt, ob die adenovirale DNA-Replikation in Abhängigkeit zum adenoviral vermittelten anti-MDR1 RNAi-Effekt steht.

Dafür wurden subkonfluente humane *multidrug*-resistente MDR1/P-gp überexprimierende HeLaRDB und EPG85-257RDB mit dem hoch effizienten anti-MDR1 shRNA kodierenden Adenovirus Ad5U6/MDR-C und unterschiedlichen MOI (MOI 0,5; 1; 2,5 und 5) transduziert. Als Kontrolle diente das anti-LacZ shRNA kodierende Adenovirus Ad5U6/LacZ (MOI 5), welches wie erwartet keinen Einfluss auf das MDR mRNA-Level der *multidrug*-resistenten Tumorzellen zeigte. Die transduzierten Tumorzellen wurden vergleichend mit und ohne 5 mM Hydroxyurea behandelt.

Nach 3 Tagen wurden detaillierte E2A*late*- und MDR1-mRNA-Expressionsanalysen mittels quantitativer RT-PCR durchgeführt. Die Detektion der E2A*late*-mRNA Expression verdeutlicht die adenovirale Replikation innerhalb der Tumorzellen mit und ohne Hydroxyurea (HU)-Behandlung (Abb. 25). In mit MOI 5 infizierten HeLaRDB wird eine starke adenovirale Replikation detektiert (48.000 E2A*late* Kopien, Abb. 25A). Gleiche Untersuchungen mit den EPG85-257RDB zeigten eine vergleichbare E2A*late*-mRNA Expression (35.000 E2A*late* Kopien, Abb. 25B).

In den Zytostatika-sensitiven HeLa bzw. EPG85-257P wurde eine sehr viel geringere Anzahl an E2A*late* Kopie detektiert (7.300 bzw. 5.400 E2A*late* Kopien), wobei beachtet werden muss, dass auch die am Beginn des Experiments verabreichte Virusdosis in diese E2A*late*-Quantifizierung mit einbezogen wird. Deshalb kann in beiden parentalen Tumorzelllinien nur von einer geringen Adenovirusreplikation ausgegangen werden.

Eine Behandlung der infizierten Zellen mit 5 mM Hydroxyurea inhibierte die adenovirale DNA-Replikation in beiden verwendeten *multidrug*-resistenten Tumorzellen hoch signifikant (Abb. 25A und B, jeweils rechts). In den HeLaRDB bzw. EPG85-257RDB wurden für Ad5U6/MDR-C (MOI5) nur noch (3000 bzw. 1300 E2A*late* Kopien) detektiert.

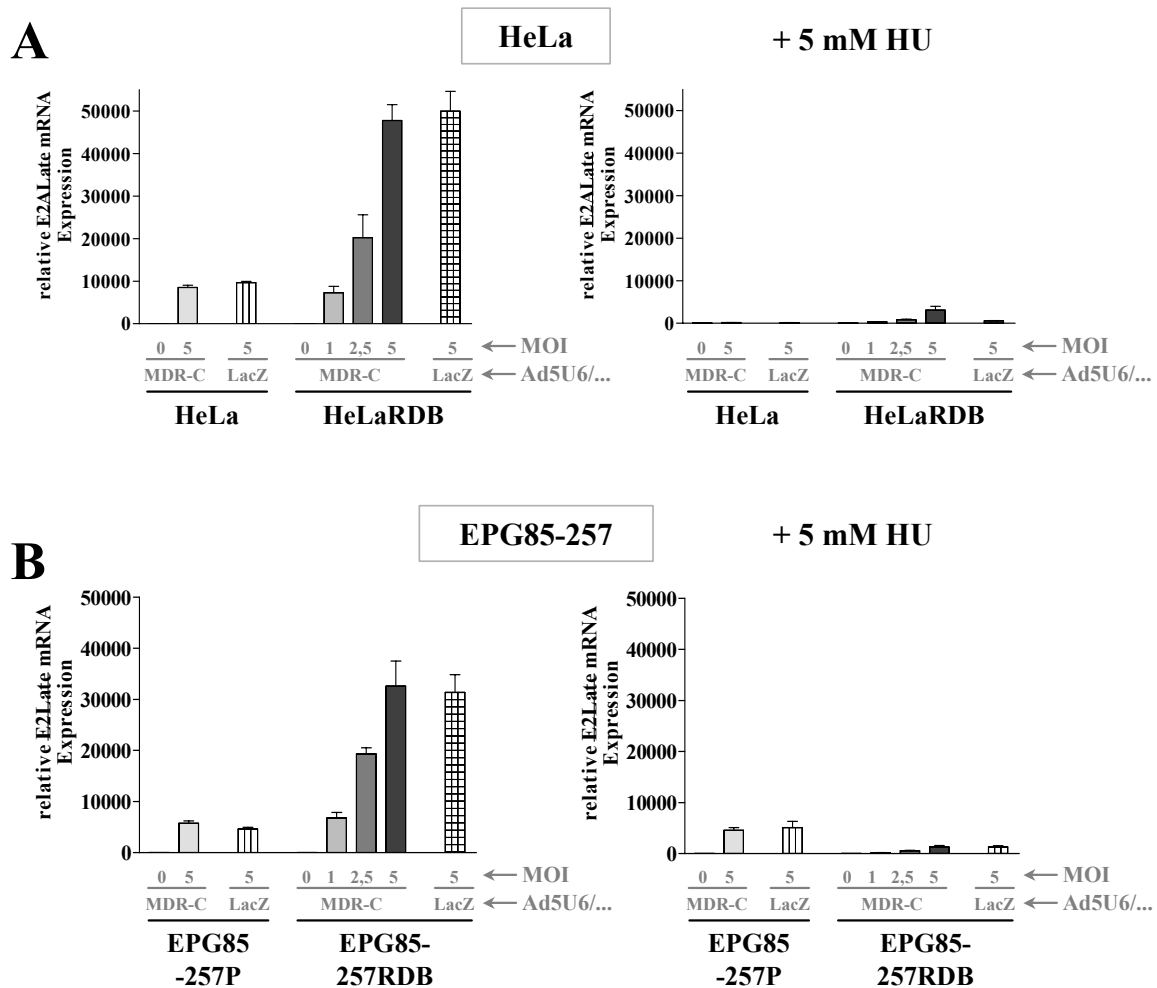


Abb. 25: mittels Hydroxyurea (HU) reduzierte adenovirale Replikation

Quantifizierung der E2Late-mRNA Expression nach Transduktion von parentalen **(A)** HeLa bzw. **(B)** EPG85-257P) und *multidrug*-resistenten **(A)** HeLaRDB bzw. **(B)** EPG85-257RDB) Tumorzelllinien mit Ad5U6/MDR-C (MOI 1, 2,5 und 5) und Ad5U6/LacZ (MOI 5), ohne (**links**) sowie (**rechts**) mit Hydroxyurea (HU)-Behandlung (5 mM). Die relative E2Late-mRNA Expression wurde auf die GAPDH-mRNA Expression normalisiert und die MDR1/GAPDH Ratio der nicht infizierten *multidrug*-resistenten HeLaRDB auf 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation berechnet (n.s. = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

Die Untersuchung der mRNA-Expression von MDR1 zeigt die Spezifität der adenoviral exprimierten anti-MDR1 shRNA (Ad5U6/MDR-C) im direkten Vergleich zum Adenovirus Ad5U6/LacZ sowie die Auswirkung der HU-Behandlung auf den adenoviralen Replikationszyklus und die damit verbundene anti-MDR1 shRNA Expressions-Effektivität (Abb. 26). Die MDR1 mRNA Expression der nicht infizierten Tumorzellen wurde jeweils 100 % gesetzt und die Werte der mit Ad5U6/MDR-C behandelten in Relation berechnet. Mit MOI 5 konnte 55,3 % (HeLaRDB, Abb. 26A) bzw. 50,2 % (EPG85-257RDB, Abb. 26B) weniger MDR1 Transkript detektiert werden. Nach Behandlung mit 5 mM Hydroxyurea

konnten sogar 59,7 % (HeLaRDB) bzw. 62,0 % (EPG85-257RDB) weniger MDR1 Transkript detektiert werden. Trotz Hemmung der adenoviralen Replikation wurde die anti-MDR1 RNAi-Effizienz von Ad5U6/MDR-C nicht verringert, sondern sogar erhöht. Das anti-LacZ shRNA exprimierende Adenovirus Ad5U6/LacZ (MOI 5) beeinflusste die MDR1-Expression der *multidrug*-resistenten Tumorzellen erwartungsgemäß nicht.

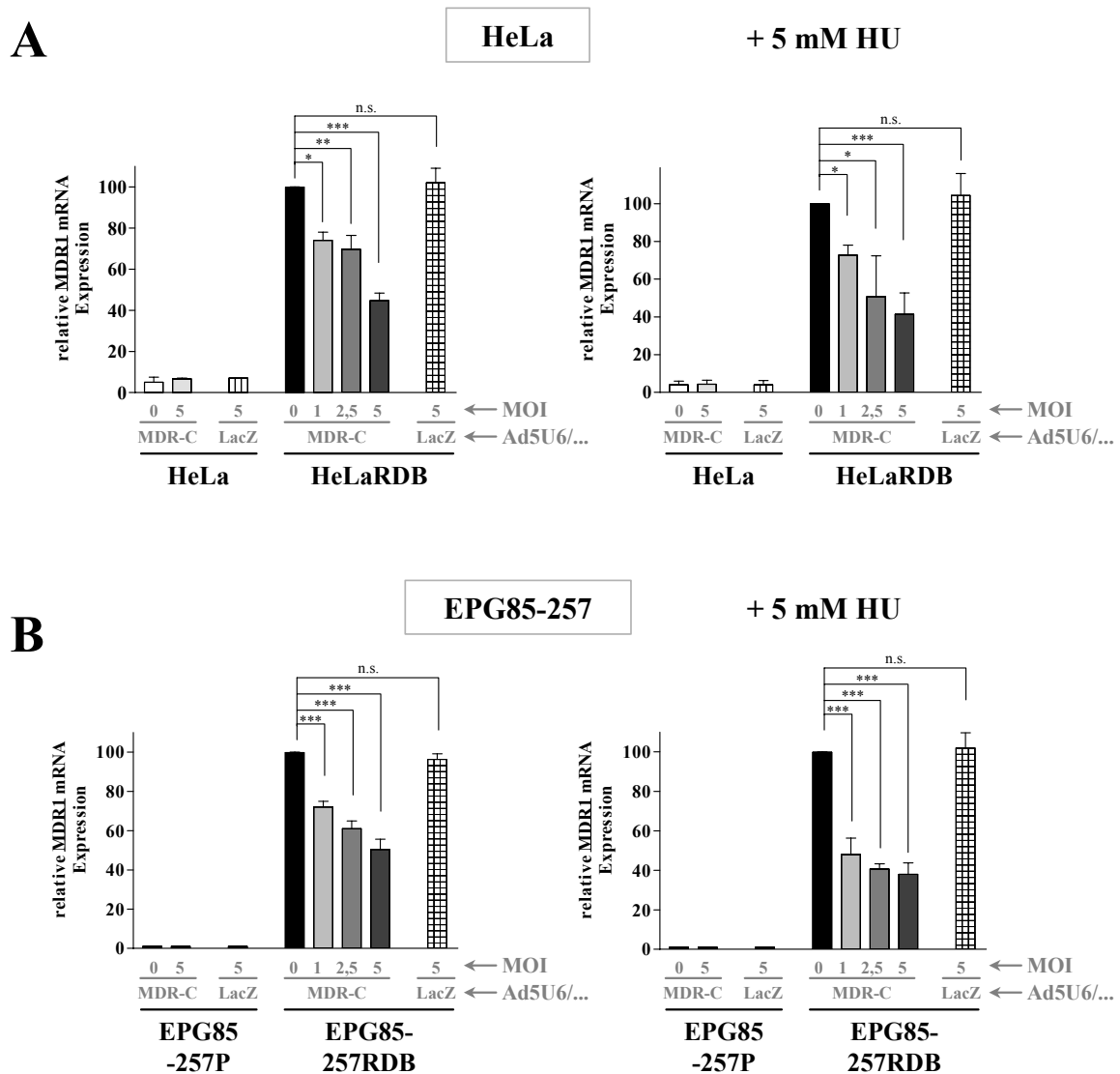


Abb. 26: mittels HU reduzierte Ad-Replikation und ihr Einfluss auf die anti-MDR1 RNAi

Quantifizierung der MDR1-mRNA Expression nach Transduktion von parentalen (A) HeLa bzw. (B) EPG85-257P) und *multidrug*-resistenten (A) HeLaRDB bzw. (B) EPG85-257RDB) Tumorzelllinien mit Ad5U6/MDR-C (MOI 1, 2,5 und 5) und Ad5U6/LacZ (MOI 5), ohne (links) sowie (rechts) mit Hydroxyurea (HU)-Behandlung (5 mM). Die relative E2A*late*-mRNA Expression wurde auf die GAPDH-mRNA Expression normalisiert und die MDR1/GAPDH Ratio der nicht infizierten *multidrug*-resistenten HeLaRDB auf 100 % gesetzt und die weiteren Werte in Relation berechnet (n.s. = nicht signifikant; * = $p < 0,1$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$).

4.6 YB-1-Expression in Tumorzellen

Wie unter 1.5.1 beschrieben, befindet sich das Protein YB-1 im wesentlichen im Zytoplasma, ist aber fähig sich während des Übergangs von der G1- in die S-Phase in den Zellkern zu lokalisieren, um die Gentranskription zu regulieren (Soop *et al.*, 2003).

Die Behandlung von humanen Tumorzellen mit UV, Hyperthermie oder Zytostatika resultiert in einer permanenten Akkumulation von YB-1 im Nukleus (Koike *et al.*, 1997; Stein *et al.*, 2001; Yahata *et al.*, 2002). Eine gesteigerte nukleäre und/oder zytoplasmatische Expression von YB-1 konnte in einer Reihe von Tumoren einschließlich Brust-, Schilddrüsen-, Ovarial-, Gebärmutterhals- und kolorektale Neoplasien sowie bei Osteo- und Synovialsarkom wiederholt detektiert werden (Bargou *et al.*, 1997; Montani *et al.*, 1998; Kamura *et al.*, 1999; Lasham *et al.*, 2000; Shibao *et al.*, 1999; Oda *et al.*, 1998; Oda *et al.*, 2003).

Auch die innerhalb dieser Arbeit verwendeten und in Abb. 27 dargestellten *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien EPG85-257RDB und HeLaRDB weisen eine starke nukleäre Akkumulation von YB-1 (rot) auf, wohingegen die parental gegenüber Zytostatika sensitiven EPG85-257P und HeLa hauptsächlich eine zytoplasmatische bzw. perinukleäre YB-1-Lokalisation zeigen. Die Nuklei sind jeweils mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt.

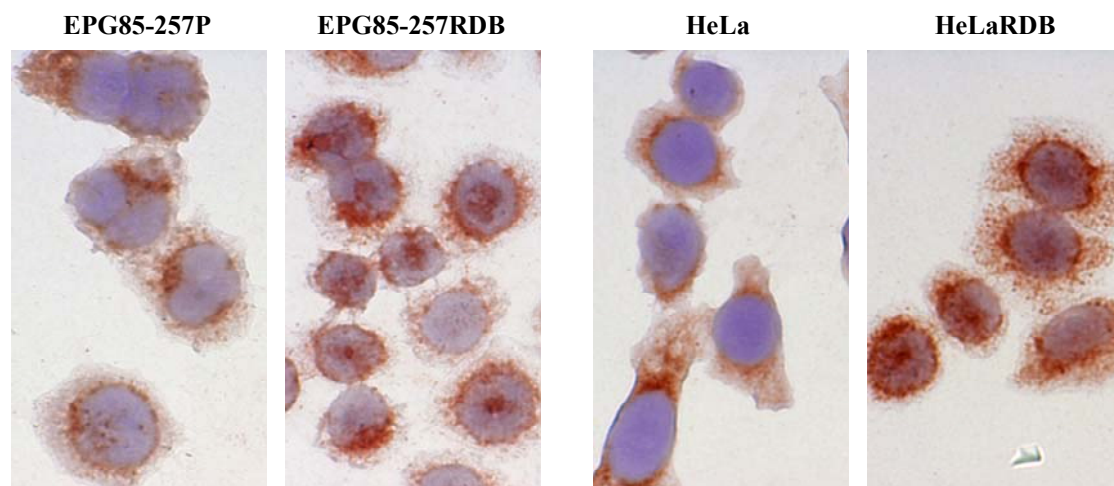


Abb. 27: Immunzytochemischer Nachweis von YB-1

Die Färbungen und Fotografien wurden von Dr. P. Surowiak angefertigt. Zytoplasmatisch-perinukleäre Expression von YB-1 (rot) in den gegenüber Zytostatika sensitiven Karzinomzelllinien EPG85-257P sowie HeLa. Erhöhte nukleäre Akkumulation in den jeweils *multidrug*-resistenten Varianten (EPG85-257RDB und HeLaRDB). Gegenfärbung der Zellnuklei (blau) mittels Hämatoxylin; Vergrößerung 1:400.

4.7 Repression des Y-box Proteins 1 (YB-1)

U. Müller (2005) entwickelte unter Verwendung der innerhalb dieser Arbeit verwendeten Magenkarzinomzelllinien EPG85-257 ein Zellsystem, in welchem die Expression von YB-1 mittels RNA-Interferenz selektiv inhibiert wird (EPG85-257P/antiYB-1 und EPG85-257RDB/antiYB-1). Da YB-1 als wichtiges Regulatorprotein fungiert (Abb. 4) und damit essentiell für jede Zelle ist, wurde ein induzierbar anti-YB-1 shRNA exprimierendes Zellsystem etabliert, welches eine gesteuerte YB-1-Inhibition über einen definierten Zeitraum erlaubt.

Das in die MDR-Tumorzellmodelle EPG85-257P und EPG85-257RDB integrierte Tetrazyklinrepressorgen kodiert für den Tetrazyklinrepressor (TetR, Abb. 28) und unterdrückt nach Bindung an den Tetrazyklinoperator (TetO) die anti-YB-1 shRNA-Expression. Nach Zugabe von Doxycyclin (ein semisynthetisches Derivat von Tetrazyklin), kommt es zur Komplexbildung von Doxycyclin mit dem Tetrazyklinrepressor. TetR verliert dadurch seine Affinität gegenüber dem Tetrazyklinoperator und die Transkription der anti-YB-1 shRNA wird induziert (Abb. 28).

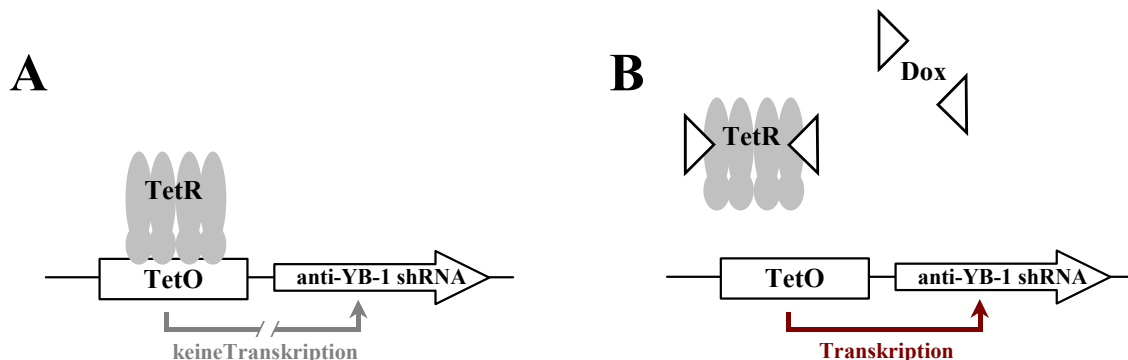


Abb. 28: TetR vermittelte Regulation der anti-YB-1 shRNA Transkription (nach Hillen und Berens, 2002)

(A) Der Tetrazyklin-Repressor (TetR) bindet an den Tetrazyklin-Operator (TetO) innerhalb des H1-Promotors und unterdrückt die Transkription der für anti-YB-1 shRNA kodierenden Sequenzen. (B) Die Zugabe des Induktors Doxycyclin (Dox) bewirkt das Ablösen des TetR vom TetO und die anti-YB-1 shRNA wird transkribiert.

Doxycyclin weist eine strukturelle Ähnlichkeit mit dem innerhalb dieser Arbeit verwendeten Zytostatikum Daunorubicin auf. MDR1/P-gp exprimierende Zellen zeigen im Vergleich zu Zellen ohne diesen ABC-Transporter eine reduzierte intrazelluläre Akkumulation von Doxycyclin. Das weist darauf hin, dass Doxycyclin ein Substrat von MDR1/P-gp ist und zudem die Expression von MDR1/P-gp induziert (Mealey *et al.*, 2002).

Gewöhnlich genügen innerhalb des TetR-Systems sehr geringe Doxycyclin-Konzentrationen (10-1000 ng/ml) zur vollständigen Transkriptionsinduktion. Da die Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB ein hohes MDR1/P-gp-Expressionslevel aufweist, wurden 2 µg/ml Doxycyclin dem Kulturmedium zugesetzt, um eine starke YB-1 shRNA-Expression zu induzieren, ohne dass sich dies auf die Zellen zytotoxisch auswirkte (Daten nicht gezeigt) und dennoch eine die anti-YB-1 shRNA-Transkription induzierfähige Konzentration von Doxycyclin innerhalb der Zelle verblieb.

4.7.1 Inhibition der mRNA und Protein Expression von YB-1

Abb. 29 zeigt die auf ein nicht detektierbares Level erfolgreich reduzierte YB-1 mRNA Expression (Abb. 29A) sowie die fast vollständige Repression des Proteins YB-1 (Abb. 29B) nach fünftägigem Zusatz von 2 µg/ml Doxycyclin und damit erfolgreicher Induktion der anti-YB-1 shRNA Transkription in beiden Tumorzellvarianten EPG85-257P/antiYB-1 und EPG85257RDB/antiYB-1. Doxycyclin zeigte erwartungsgemäß keine Effekte auf die YB-1 Expression der Ausgangszelllinien EPG85-257P bzw. EPG85-257RDB.

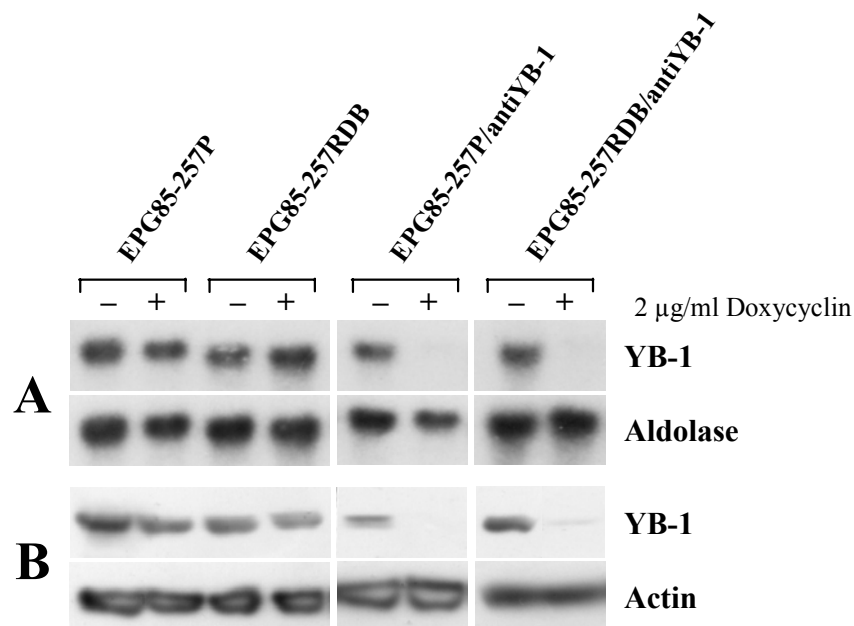


Abb. 29: Induktion der YB-1 Repression mittels Doxycyclin

(A) Northern Blot Analyse der YB-1 kodierenden mRNA und (B) Western Blot Analyse des Regulatorproteins YB-1 in humanen *multidrug*-sensitiven Magenkarzinomzelllinien EPG85-257P, *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB und deren induzierbar anti-YB-1 shRNA exprimierenden Varianten EPG85-257P/antiYB-1 bzw. EPG85-257RDB/antiYB-1 5 Tage nach Doxycyclin-Induktion (2 µg/ml). Interne Beladungskontrolle mit (A) Aldolase-spezifischer cDNA bzw. (B) Actin-spezifischem Antikörper.

4.7.2 Keine Beeinflussung der MDR1 Expression nach YB-1-Repression

Mit den MDR-Zellmodellen EPG85-257P/antiYB-1 und EPG85-257RDB/antiYB-1 bestand erstmals die Möglichkeit, die einleitend beschriebene Relation zwischen YB-1 Expression und MDR1 Überexpression zu studieren. Dafür wurde die anti-YB-1 shRNA Expressionskassette über einen Zeitraum von insgesamt 20 Tagen mittels Doxycyclin angeschaltet und jeden 5. Tag die YB-1- sowie MDR1-mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR parallel untersucht. Das Experiment musste an Tag 20 beendet werden, da sich über diesen langen Zeitraum die YB-1-Repression letal auswirkte.

Wie Abb. 30A zeigt, unterscheidet sich die YB-1-Ausgangsexpression (Tag 0) der EPG85-257P/antiYB-1 und EPG85-257RDB/antiYB-1 erwartungsgemäß nicht signifikant von den EPG85-257P bzw. EPG85-257RDB. Die relative YB-1 mRNA Expression der *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinie liegt durchschnittlich 30 % unter der der parentalen Ausgangszelllinie.

Nach Induktion der anti-YB-1 shRNA Expressionskassette (> Tag 0) konnte eine posttranskriptionelle Inhibition der YB-1 Expression über den gesamten untersuchten Zeitraum aufrecht erhalten werden: die Repressionseffizienz der anti-YB-1 shRNA erreichte bei den EPG85-257P/antiYB-1 durchschnittlich 88,8 % bzw. 92,3 % bei den EPG85-257RDB/antiYB-1 (Abb. 30A).

Für die in Abb. 30A dargestellten Proben wurde parallel das MDR1-mRNA Expressionsprofil während der anti-YB-1 shRNA Induktion bestimmt. Diese sind in Abb. 30B dargestellt. Die MDR1 mRNA Expression der unbehandelten EPG85-257RDB ist mit 100 % angegeben. An Tag 5 kann ein geringes Absinken der mRNA-Expression von MDR1 um 14 % detektiert werden, welches aber nicht signifikant ist. Über den gesamten Zeitraum von 20 Tagen, in dem YB-1 in den MDR1 überexprimierenden EPG85-257RDB/antiYB-1 zu 92,3 % reprimiert wurde, blieb die MDR1 mRNA Expression konstant.

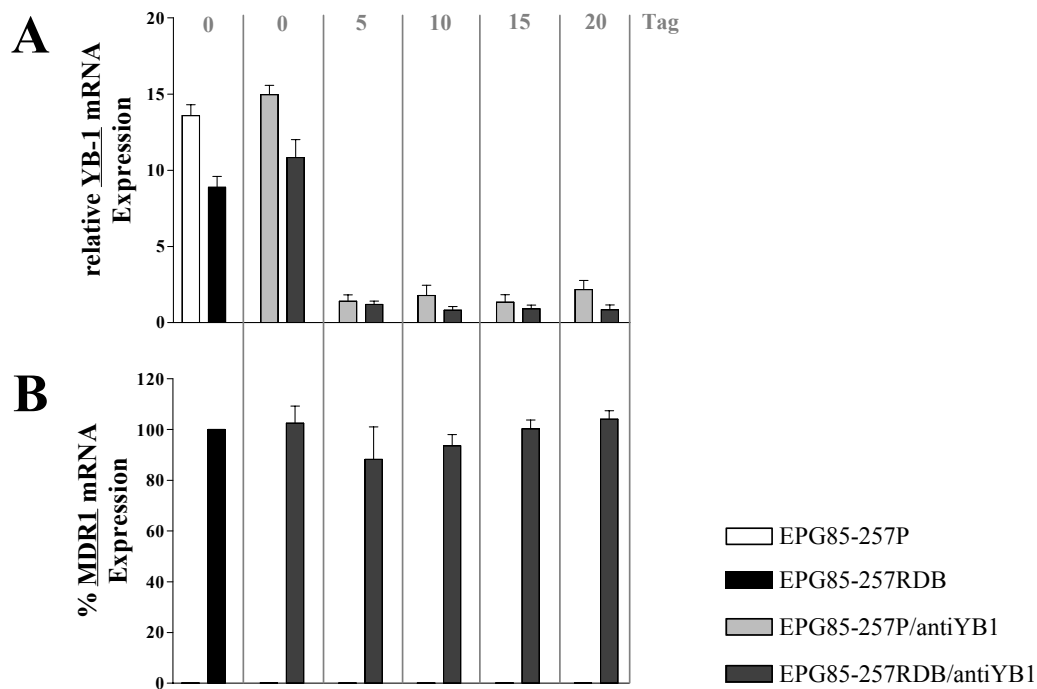


Abb. 30: Stabile Repression von YB-1 über maximal 20 Tage

Quantifizierung der (A) YB-1 und (B) MDR1 mRNA Expression in humanen *multidrug*-sensitiven Magenkarzinomzelllinien EPG85-257P, *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB und deren induzierbar anti-YB-1 shRNA exprimierenden Varianten EPG85-257P/antiYB-1 bzw. EPG85-257RDB/antiYB-1 nach 0, 5, 10, 15 und 20 Tage währender Doxycyclin-Induktion (2 µg/ml) der YB-1-Repression. Die jeweilige mRNA Expression wurde auf die mRNA Expression des *housekeeping* Gens GAPDH normalisiert.

4.7.3 Doxycyclin und adenovirale Transduktion fördern die YB-1 Expression

Wie in der quantitativen RT-PCR Analyse (Abb. 31) gezeigt, bedingt eine Inkubation mit Doxycyclin allein einen nicht signifikanten und damit vernachlässigbaren Anstieg der YB-1 mRNA Expression in EPG85-257RDB. In der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB/antiYB-1 bewirkt Doxycyclin erwartungsgemäß eine Herabsetzung der YB-1 mRNA Expression um ~90 % ($p < 0,001$).

Dagegen bewirkt die adenovirale Transduktion mit MOI 10 eine Zunahme der YB-1 mRNA Expression in den EPG85-257P um 49 % ($p < 0,1$), als auch in den EPG85-257RDB um 57 % ($p < 0,001$). Dieser Effekt wird durch die kombinierte Gabe von 2 µg/ml Doxycyclin und adenoviraler Transduktion noch verstärkt: in den EPG85-257RDB steigt die YB-1 mRNA Expression im Vergleich zur unbehandelten Zelllinie um 153 % ($p < 0,001$). Wird wie in nachfolgenden Experimenten die anti-YB-1 shRNA Expressionskassette mittels Doxycyclin aktiviert und EPG85-257RDB/antiYB-1 adenoviral transduziert, verursacht eine MOI von 10

ebenfalls eine Steigerung der bereits zu ~90 % inhibierten YB-1 mRNA Expression. Diese ist aber nicht signifikant (Abb. 31).

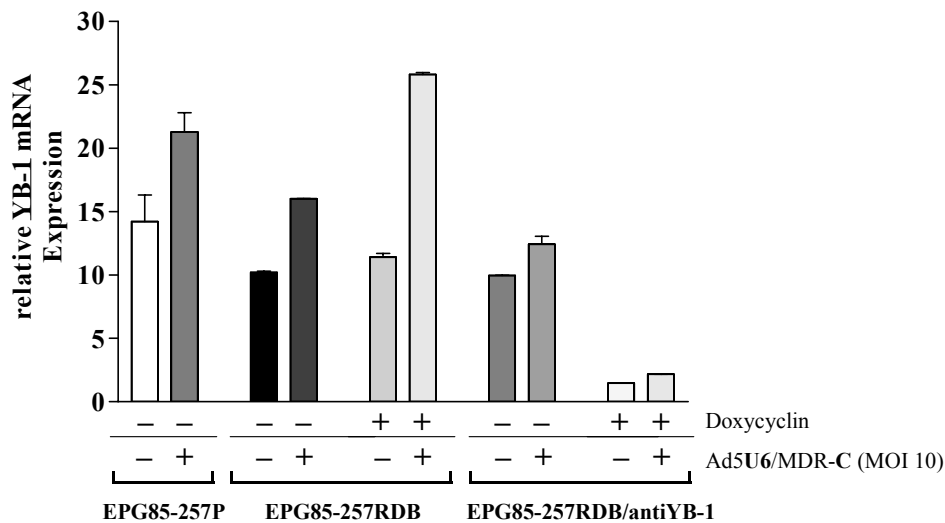


Abb. 31: Doxycyclin und adenovirale Transduktion steigern die YB-1 mRNA Expression

Quantifizierung der relativen YB-1 mRNA Expression (normalisiert auf die 18S rRNA Expression) in humanen *multidrug*-sensitiven Magenkarzinomzelllinien EPG85-257P, *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB und deren induzierbar anti-YB-1 shRNA exprimierende Variante EPG85-257RDB/antiYB-1 mit (+) und ohne (-) Doxycyclin-Induktion (2 µg/ml) sowie mit (+) und ohne (-) adenoviraler Transduktion mit Ad5U6/MDR-C (MOI 10).

4.8 Unterdrückung der adenoviralen Replikation nach YB-1 Repression

Alle folgenden Experimente wurden mit dem hoch effizient anti-MDR1 RNAi vermittelnden Adenovirus Ad5U6/MDR-C durchgeführt. Werden EPG85-257P/antiYB-1 bzw. EPG85-257RDB/antiYB-1 adenoviral transduziert, führt dies wie in Abb. 32A gezeigt, zu einer MOI-abhängigen Induktion der YB-1 Expression, auch wenn die ins Genom integrierte anti-YB-1 shRNA Expressionskassette angeschaltet und damit YB-1 zu 90 % reprimiert wird.

Abb. 32B (links) bestätigt, dass eine adenovirale Replikation und damit eine erhöhte Kopienzahl von adenoviraler E2A_{late} mRNA innerhalb der parentalen Magenkarzinomzelllinie EPG85-257P/antiYB-1 nicht unterstützt wird. Die in geringem Umfang detektierte Kopienzahl von E2A_{late} mRNA entspricht der während der Transduktion eingesetzten Adenovirusdosis. Wird YB-1 unter Doxycyclin-Induktion der anti-YB-1 shRNA

Transkription reprimiert, hat dies in der parentalen Variante der Magenkarzinomzelllinie natürlich keine Auswirkung auf die adenovirale Replikation.

Bestimmt man hingegen in adenoviral transduzierten *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1 die Kopienzahl von E2A_{late} als einen Indikator der Adenovirus-replikation, wird eine starke adenovirale Replikation detektiert (5,5 Mio. E2A_{late} Kopien, Abb. 32B). Wird aber die zelluläre YB-1 Expression um 90 % reprimiert (Abb. 32A, rechts), resultiert eine Hemmung der adenoviralen Replikation zu 66,5 % auf 1,7 Mio. E2A_{late} Kopien (Abb. 32B, rechts). Die Anzahl der E2A_{late} Kopien versteht sich jeweils relativ zur Anzahl der zellulär transkribierten 18S rRNA-Moleküle.

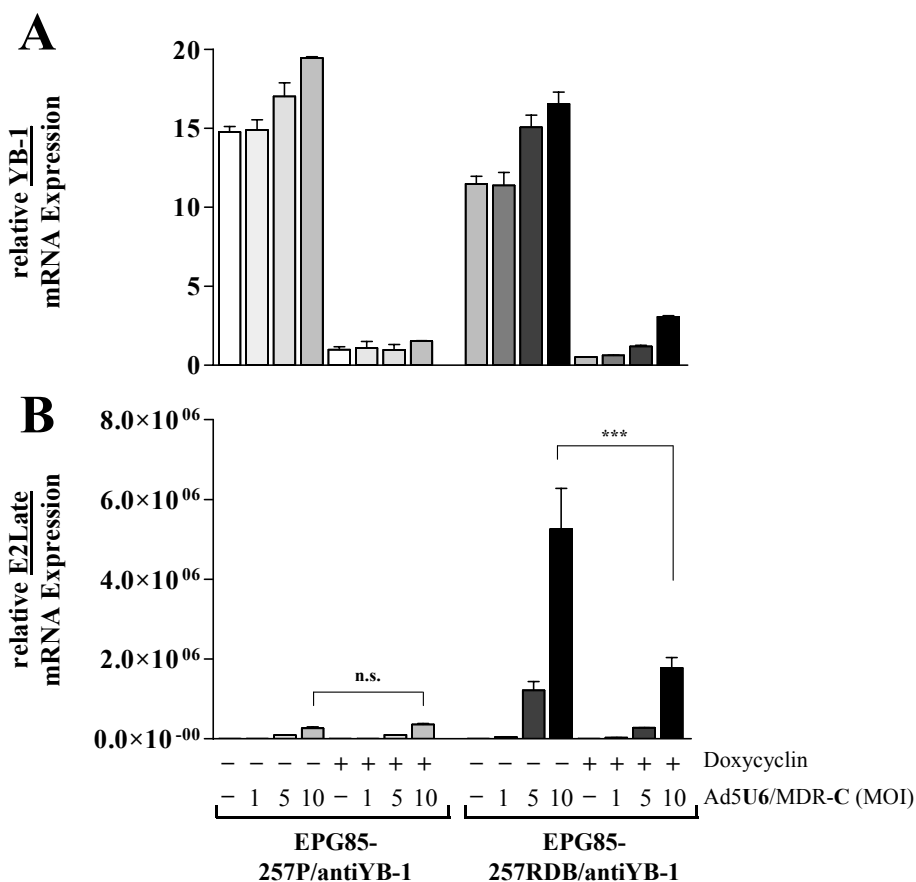


Abb. 32: YB-1 Repression bedingt verringerte Replikationseffizienz von Adenoviren

Vergleichende Quantifizierung der (A) relativen zellulären YB-1 mRNA Expression sowie (B) relativen adenoviralen E2A_{late} mRNA Expression (jeweils normalisiert auf die 18S rRNA Expression) in induzierbar anti-YB-1 shRNA exprimierenden *multidrug*-sensitiven Magenkarzinomzelllinien EPG85-257P/antiYB-1 und *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1 mit (+) und ohne (-) Doxycyclin-Induktion der YB-1-Inhibition sowie aufsteigender Adenovirusdosen von Ad5U6/MDR-C. Die Beschriftung bezieht sich auf beide Abbildungen. (n.s. = nicht signifikant; *** = $p < 0,001$).

Nachdem eine Abhängigkeit zwischen YB-1 Repression und reduzierter adenoviraler Replikation auf Basis von quantitativen RT-PCR Messungen betreffs der E2A_{late} mRNA Expression detektiert wurde, musste nun auch nachgewiesen werden, ob diese sich durch den Nachweis einer verringerten Virusmaturation (*self-assembly*) infektiöser Adenoviruspartikel bestätigen lassen. Die Virusmaturation schließt den adenoviralen Replikationszyklus ab.

Das Adenoviruskapsid besteht aus 252 Kapsomeren, davon gehören 12 zu den Pentonkapsomeren und 240 zu den Hexonkapsomeren (Philipson, 1983). Deshalb kann zum Nachweis funktionaler Adenovirus-Nachkommen (Virionen) ein anti-Hexon Antikörper verwendet werden.

Zur Analyse der Hexonkapsomer-Expression wurden *multidrug*-sensitive EPG85-257P, *multidrug*-resistente EPG85-257RDB sowie EPG85-257RDB/antiYB-1 mit induzierter YB-1 Inhibition ausgesät und mit Adenovirus (MOI 5) transduziert. Jeweils nach 24 h und 120 h wurden die infizierten Zellen fixiert und mit dem Hexon-Antikörper inkubiert. Ein sekundärer HRP-konjugierter Antikörper amplifiziert das Signal des anti-Hexon Antikörpers und die nachfolgende Inkubation mit einem DAB-Substrat führt zu dessen enzymatischer Umsetzung und der Entstehung permanenter brauner Signale, die lichtmikroskopisch mit einer 20x-Vergößerung repräsentativ dargestellt werden konnten. Mittels dieser Versuchsanordnung kann eine durch die Virusreplikation zeitlich bedingte (24 h → 120 h) Zunahme von braun angefärbten Tumorzellen detektiert werden.

Der Zellkulturüberstand, in den potentiell entstandene Adenovirus-Nachkommen nach einem vollständigen Replikationszyklus nach 120 h abgegeben werden, wurde vor dem Fixierungsschritt abgenommen und auf jeweils frisch ausgesäte Tumorzellen gegeben. Diese wurden nach 24 h ebenfalls mit dem Hexon-Antkörper behandelt, um die Infektiosität der freigesetzten Virionen im Überstand zu detektieren.

Abb. 33 zeigt den immunzytochemischen Nachweis von Hexonkapsomeren in infizierten humanen Magenkarzinomzellen mit und ohne YB-1 Inhibition. In *multidrug*-sensitiven EPG85-257P erfolgt keine detektierbare adenovirale Replikation, vergleicht man braun gefärbte Zellen nach 24 h und 120 h. Auch im Überstand befinden sich keine neu generierten Virionen, die frisch ausgesäte EPG85-257P infizieren können (Abb. 33A). Gleiche Ergebnisse wurden mit den parentalen Magenkarzinomzellen erzielt, in denen YB-1 inhibiert wurde (Daten nicht gezeigt).

Dagegen replizieren Adenoviren in *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB im vorgegebenen Rahmen von 120 h effizient. Abb. 33B zeigt eine deutliche Zunahme braun gefärbter

Tumorzellen (24 h → 120 h) und damit eine erfolgreiche adenovirale Replikation der eigentlich replikationsinkompetenten Δ E1-Adenovirusmutante Ad5U6/MDR-C. Auch befand sich nach 120 h eine genügend große Anzahl adenoviraler Nachkommen im Zellkulturüberstand, welche wiederum zur Infektion frisch ausgesäter EPG85-257RDB befähigt waren (Abb. 33B).

Dagegen ergibt sich für EPG85-257RDB/antiYB-1, in denen YB-1 inhibiert wurde, das gleiche Bild wie für die parentalen EPG85-257P (Abb. 33C). Das heißt, die ursprünglich zur adenoviralen Replikation befähigte *multidrug*-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB kann aufgrund einer induzierten YB-1 Repression keine adenoviralen Nachkommen mehr produzieren und in den Zellkulturüberstand entlassen, um benachbarte Zellen oder neu ausgesäte Zellen zu reinfizieren.

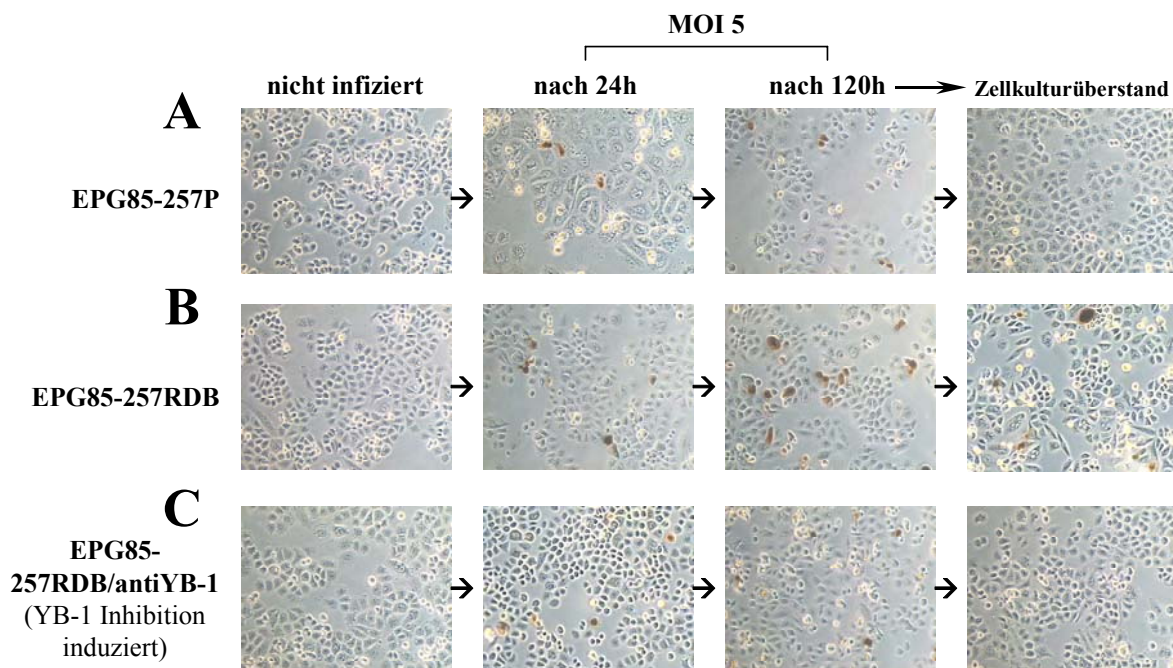


Abb. 33: YB-1 Repression hemmt die Produktion von infektiösen Adenovirus-Nachkommen

Nachweis der Transduktion und Replikation von Ad5U6/MDR-C nach Infektion mit MOI 5 nach 24 h und 120 h sowie Analyse des Zellkulturüberstandes auf infektiöse adenovirale Nachkommen mittels anti-Hexon-Antikörper in (A) die adenovirale Replikation nicht unterstützenden *multidrug*-sensitiven EPG85-257P, in (B) die adenovirale Replikation fördernden EPG85-257RDB sowie (C) in induziert RNAi-vermittelt YB-1 reprimierten *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1, die die adenovirale Replikation nun unterdrücken.

Nachdem mittels zwei unabhängiger Methoden der Nachweis erbracht wurde, dass eine Inhibition des Transkriptionsfaktors YB-1 die adenovirale Replikation gehemmt wird, wurden von Dr. P. Surowiak immunzytologische Untersuchungen durchgeführt und mit einer 400x Vergrößerung detektiert (3.2.20).

Abb. 34 zeigt immunzytochemische Färbungen (rot) von zellulärer YB-1- und adenoviraler Hexon-Expression in repräsentativ fotografierten *multidrug*-sensitiven EPG85-257P/antiYB-1 (Abb. 34A und B) und *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1 (Abb. 34C und D) jeweils mit und ohne induzierter YB-1 Inhibition. Die Nuklei sind mit Hämatoxylin (blau) gegengefärbt.

EPG85-257P/antiYB-1 zeigen eine zytoplasmatisch-perinukleäre Expression von YB-1 und unterstützen auch 120 h nach Transduktion keine oder nur eine sehr schwache adenovirale Replikation (Abb. 34A). Die in geringem Umfang detektierten Hexonkapsomere entsprechen der zur Infektion eingesetzten Adenovirusdosis (MOI 5). Nach Doxycyclin-Induktion der anti-YB-1 shRNA Transkription und damit erfolgreicher YB-1 Repression, kann noch etwas weniger Hexonkapsomer-Expression nachgewiesen werden (Abb. 34B). Die negativen Hexon-Färbungen der nicht infizierten Zellen bezeugen die Spezifität des anti-Hexon-Antikörpers.

Entscheidender sind jedoch die immunzytochemischen Färbungen der *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1, in denen die YB-1 reprimiert wurde (Abb. 34D). Im Vergleich zu den nicht induzierten EPG85-257RDB/antiYB-1 mit starker zellulärer YB-1- sowie adenoviraler Hexon-Expression (Abb. 34C), zeigt Abb. 34D nicht nur eine stark verringerte YB-1 Expression, sondern auch ein sehr stark minimiertes Hexonkapsomer-Signal und damit eine deutlich gehemmte Adenovirusmaturation als Abschluss der adenoviralen Replikation.

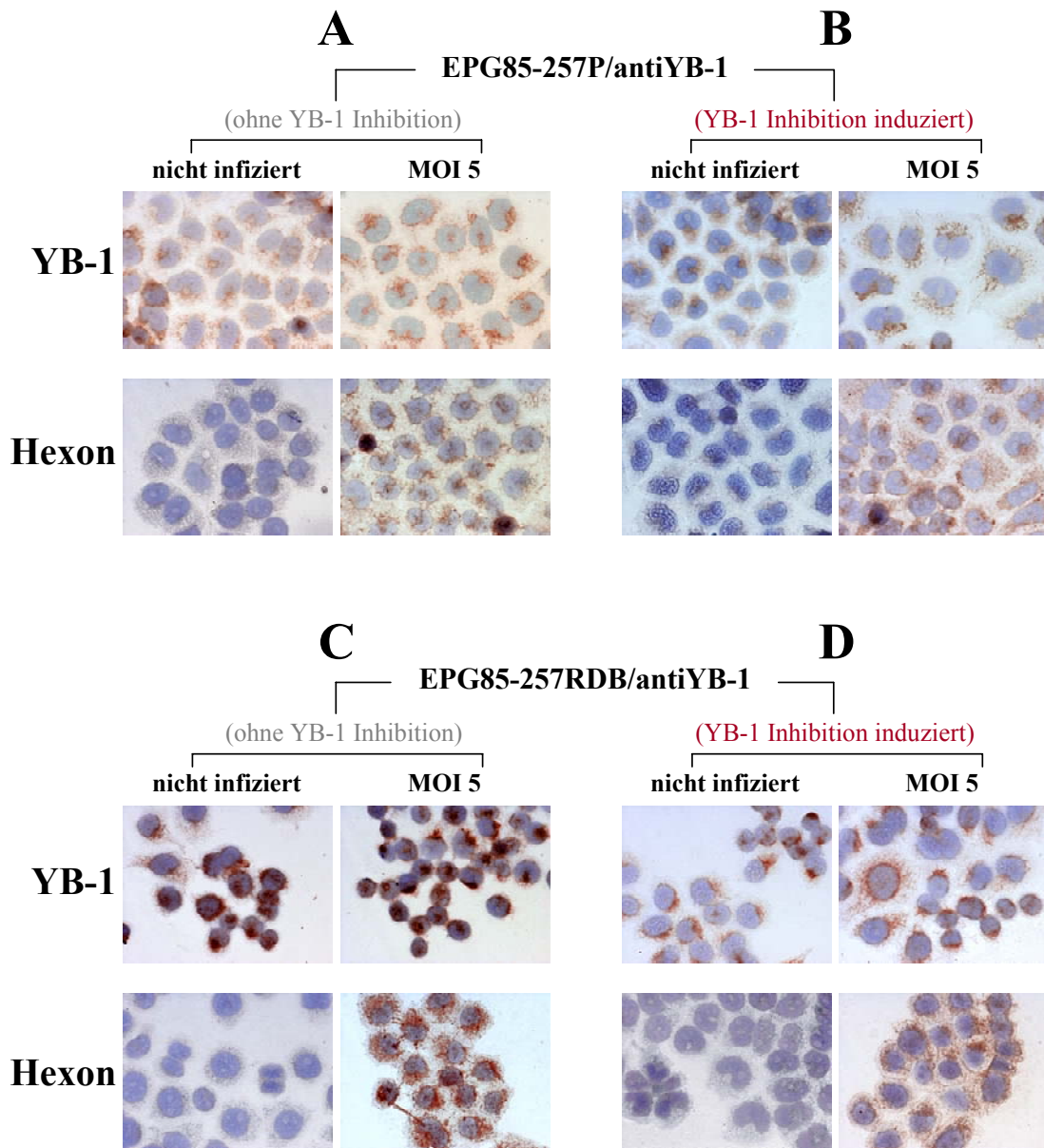


Abb. 34: Immunzytochemischer Nachweis der YB-1 Repression und Hemmung der Ad-Replikation

Die Färbungen und Fotografien wurden von Dr. P. Surowiak angefertigt. Gegenfärbung der Zellnuklei (blau) mittels Hämatoxylin; Vergrößerung 1:400.

(A) und (B): Nachweis der zytoplasmatisch-perinukleären Expression von YB-1 und der Transduktion bzw. Replikation von Ad5U6/MDR-C mittels anti-Hexon-Antikörpern 120 h nach Infektion mit MOI 5 in den die adenovirale Replikation nicht unterstützenden, gegenüber Zytostatika sensitiven EPG85-257P/antiYB-1 mit **(A)** und ohne **(B)** YB-1 Repression. Es konnte keine adenovirale Replikation detektiert werden.

(C): Nachweis der erhöhten Expression und nukleären Akkumulation von YB-1 in *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1 mit starker adenoviraler Replikation.

(D): Verminderte Replikationseffizienz nach zellulärer YB-1 Inhibition in *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1, gekennzeichnet durch geringere Hexonkapsomer-Expression.

4.9 Reduktion des adenoviral vermittelten RNAi Effekts nach YB-1 Repression

In dieser Phase der vorliegenden Arbeit wurden zwei RNA-Interferenzsysteme kombiniert. Durch die stabile Integration von induzierbaren anti-YB-1 shRNA Expressionskassetten kann der zelluläre Transkriptionsfaktor YB-1 innerhalb von Tumorzellen gehemmt werden. Gleichzeitig können diese YB-1 reprimierten Tumorzellen mit Adenoviren (Ad5U6/MDR-C) infiziert werden, welche eine ins Genom integrierte anti-MDR1 shRNA Expressionskassette enthalten, um den ABC-Transporter MDR1/P-gp zu inhibieren.

Somit kann eine weitere bedeutende Fragestellung mit nachfolgenden Experimenten beantwortet werden: beeinflusst die durch YB-1-Inhibition gehemmte adenovirale Replikation von Ad5U6/MDR-C auch die Effizienz der anti-MDR1 shRNA Transkription und damit die RNAi-vermittelte Inhibition von MDR1/P-gp zur erfolgreichen Aufhebung des *multidrug-resistant* Phänotyps humaner Tumorzellen?

Dazu wurden das MDR-Zellmodell EPG85-257RDB und sein induzierbar YB-1 reprimierendes Derivat EPG85-257RDB/antiYB-1 mit Ad5U6/MDR-C infiziert (MOI 10). Detaillierte Genexpressionsanalysen wurden wie gewöhnlich 3 Tage nach Transduktion durchgeführt und die Veränderungen der zellulären YB-1- sowie MDR1- und adenoviralen E2Alate-mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR detektiert.

Abb. 35A zeigt die YB-1 mRNA Expression der *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinie mit (+) und ohne (-) YB-1-Repression sowie mit (+) und ohne (-) adenoviraler Transduktion. Nach Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin wird die Transkription der anti-YB-1 shRNA spezifisch angeschaltet, was in einer YB-1 Repression von 90,4 % ($p < 0.001$, Abb. 35A) resultiert.

Die Resultate der quantitativen RT-PCR Analyse in Abb. 35B zeigen, dass die YB-1-Repression das Expressionslevel des adenoviralen E2Alate Genes um 74,5 % (7,1 Mio. → 1,8 Mio. E2Late Kopien) reduziert wird. Dagegen bleibt die adenovirale E2Alate Transkription in den EPG85-257RDB/antiYB-1, in denen YB-1 nicht inhibiert wurde, gleich hoch effizient wie in der Ausgangszelllinie EPG85-257RDB (7,2 Mio. E2Alate Kopien in Relation zur 18SrRNA, Abb. 35B).

Wie erwartet zeigte das innerhalb dieser Arbeit konstruierte Adenovirus Ad5U6/MDR-C eine ausgeprägte Aktivität in Bezug auf die Repression von MDR1 (Abb. 35C) in beiden *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinien EPG85-257RDB und EPG85-

257RDB/antiYB-1 (ohne YB-1 Repression). Bereits mit einer MOI von 10 kann in beiden Zelllinien schon 3 Tage nach Transduktion eine starke Inhibition der MDR1 mRNA Expression von 56 % ($p < 0,001$) bzw. 52 % ($p < 0,001$) detektiert werden.

Dagegen unterdrückt die zellulär RNAi-vermittelte YB-1 Inhibition (Abb. 35A) eine erfolgreiche adenovirale Replikation dieses $\Delta E1$ -Adenovirus (Abb. 35B) und die daraus folgende adenoviral-RNAi-vermittelte MDR1 Repressionseffizienz wird von 52 % auf 14 % reduziert (Abb. 35C).

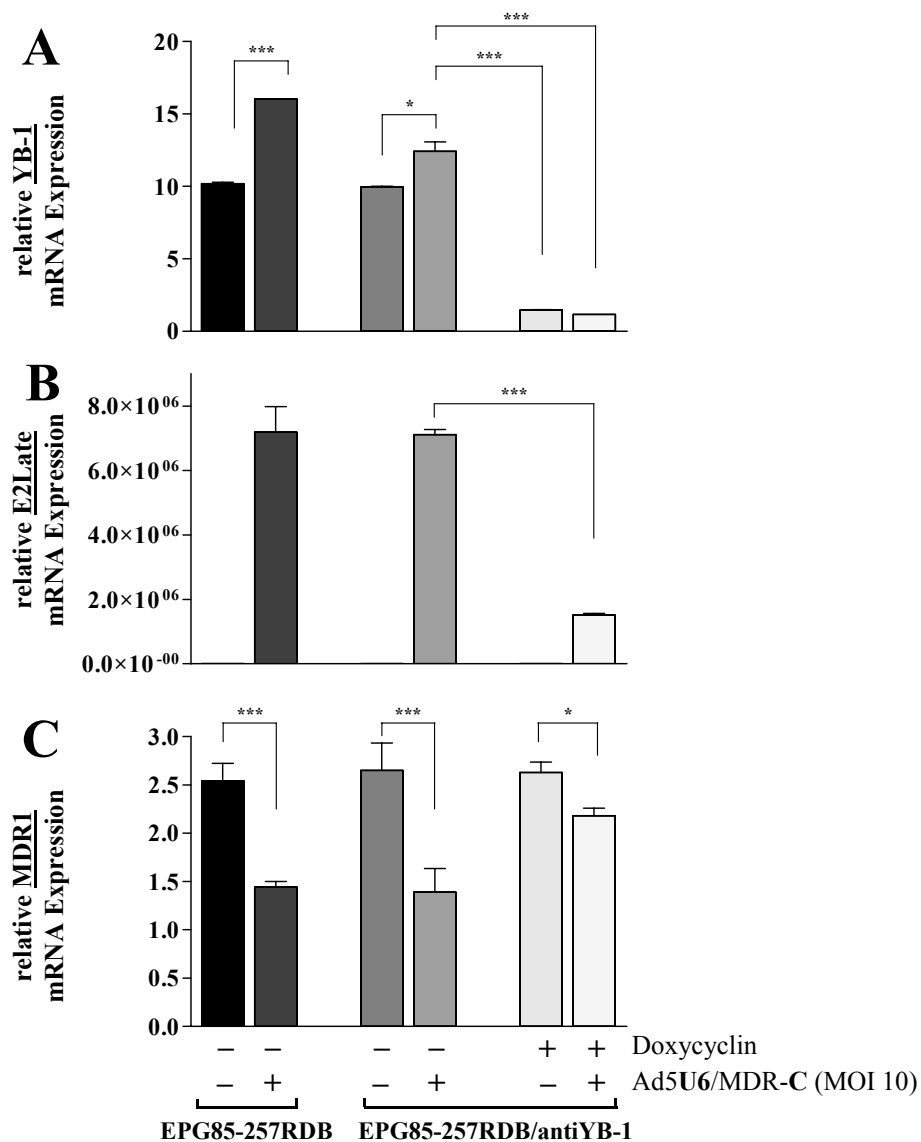


Abb. 35: Reduktion des adenoviral vermittelten RNAi Effekts nach YB-1 Repression

Vergleichende Quantifizierung der (A) YB-1-mRNA, (B) *E2Late*-mRNA und (C) MDR1-mRNA Expression mit (+) und ohne (-) zellulärer YB-1 Repression nach Transduktion mit Ad5U6/MDR-C (MOI 10) und damit adenoviral-RNAi-vermittelter MDR-1 Repression. Relative YB-1-mRNA Expression normalisiert auf die 18S rRNA Expression. Die Beschriftung bezieht sich auf alle drei Diagramme. (* = $p < 0,1$; *** = $p < 0,001$).

Zur Bestätigung, dass Ad5U6/MDR-C eine spezifische Inhibition der MDR1 Transkription bedingt und seine Effizienz durch die zelluläre YB-1 Expression gesteuert wird, wurden vergleichende MDR1 Genexpressionsanalysen auch mit Ad5U6/LacZ durchgeführt.

Dafür wurden *multidrug*-resistente EPG85-257RDB/antiYB-1 wie bereits für Abb. 35 beschrieben, mit (+) und ohne (-) Doxycyclin induziert und vergleichend zudem mit aufsteigenden Virusdosen Ad5U6/MDR-C oder Ad5U6/LacZ transduziert. Auch wurden gleichzeitig die Veränderungen der zellulären YB-1- sowie MDR1- und adenoviralen E2Alate-mRNA Expression mittels quantitativer RT-PCR detektiert. Hier abgebildet sind ausschließlich die Werte der relativen MDR1 Expression der transduzierten MDR-Modellzelllinien ohne (-) und mit (+) YB- Inhibition (Abb. 36).

Ad5U6/LacZ exprimiert eine für MDR1 unspezifische shRNA gegen die bakterielle β -Galaktosidase und vermittelt damit auch keinen RNAi Effekt auf die MDR1 Expression, gleichgültig, ob YB-1 inhibiert wird oder nicht (Abb. 36B).

Die Transduktion mit Ad5U6/MDR-C (Abb. 36A) verdeutlicht nicht nur die Effizienz dieses Virus bei der Inhibition von MDR1, sondern auch, dass eine Inhibition des zellulären Transkriptionsfaktors YB-1 die adenovirale Replikation in *multidrug*-resistenten Tumorzellen signifikant hemmt und damit die Effizienz von Ad5U6/MDR-C verringert.

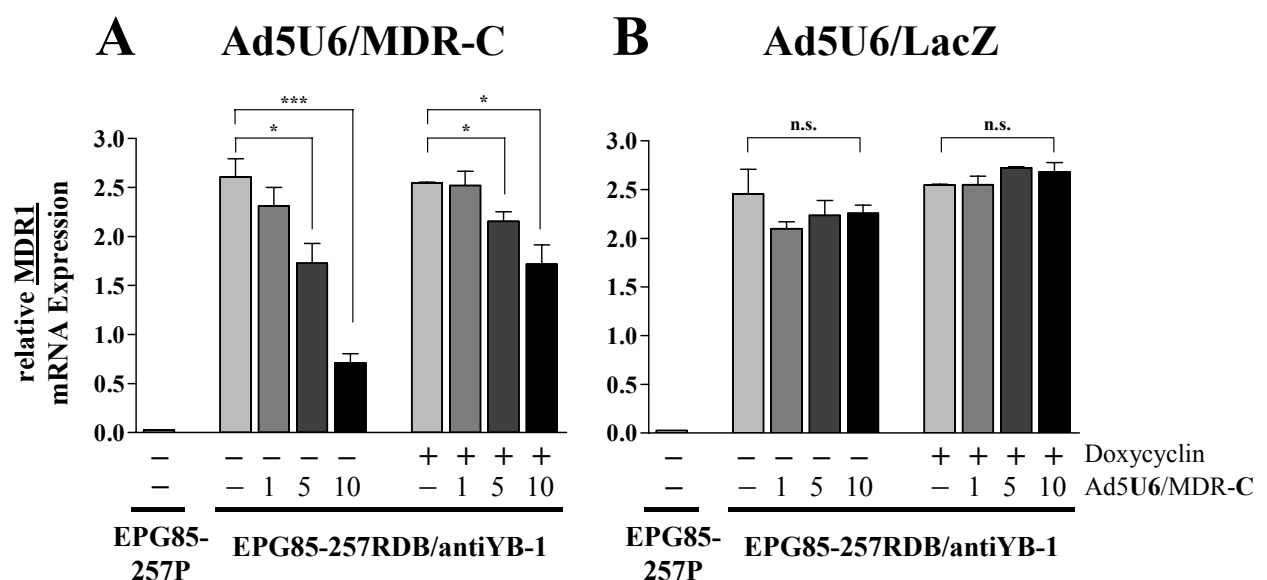


Abb. 36: Kontrolle auf Spezifität von Ad5U6/MDR-C

Quantifizierung der relativen MDR1 mRNA Expression (normalisiert auf die 18S rRNA Expression) in humanen *multidrug*-sensitiven Magenkarzinomzelllinien EPG85-257P und *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB-1 mit (+) und ohne (-) Doxycyclin-Induktion der YB-1 Repression sowie aufsteigender adenoviraler Dosis (MOI) von Ad5U6/MDR-C (A) bzw. Ad5U6/LacZ (B).

5 DISKUSSION

5.1 Idee und Hintergrund des adenoviralen Transfers von anti-MDR1 shRNAs

Krebserkrankungen können heute mit einem breiten Spektrum verschiedener Mittel und Methoden behandelt werden. Bei den meisten malignen Erkrankungen wird die adjuvante Chemotherapie bevorzugt, d.h. nach operativer Entfernung des Tumors wird eine Zytostase mit zellteilungshemmenden Medikamenten durchgeführt. Das Ziel ist, mit Hilfe der Zytostatika möglicherweise verbliebene Tumorreste und Tochtergeschwülste zu bekämpfen. In Deutschland werden jährlich etwa 15.000 Patienten mit einer Chemotherapie geheilt (Deutsche Krebsgesellschaft e.V.). Allerdings entwickeln Tumorzellen gegen die eingesetzten Zytostatika *Multidrug*-Resistenzen (MDR), die die Hauptursache für den Misserfolg einer Chemotherapie darstellen.

In welchem kurzem Zeitraum und wie effektiv Tumorzellen einen MDR-Phänotyp ausbilden können, belegen die vorgelegten Ergebnisse zur Etablierung der *multidrug*-resistenten Zervixkarzinomzelllinie HeLaRDB durch stufenweise Erhöhung der Daunorubicinkonzentration. Genexpressionsanalysen ergaben für die Sublinie HeLaRDB im Vergleich zur parentalen Linie HeLa eine gesteigerte MDR1 mRNA- und MDR1/P-gp Protein-Expression. Bei einer Induktion der MDR1/P-gp Expression spielt neben epigenetischen Veränderungen (Baker *et al.*, 2005) der MDR1 Promotor eine bedeutende Rolle (Morrow *et al.*, 1997). Dieser enthält ein *heat-shock consensus element* (van Groenigen *et al.*, 1993) und ein mutmaßliches *xenobiotic response element*, welches auf zytotoxische Wirkstoffe reagiert (Stein *et al.*, 1996; Kohno *et al.* 1989). Beide Elemente unterstützen die Prämisse, dass Daunorubicin die Expression von MDR1/P-gp induziert. Zudem gibt es eine Korrelation zwischen spezifischen Punktmutationen innerhalb des MDR1 Promotors und gesteigerter MDR1/P-g-Induktion nach Zytostatika-Behandlung (Stein *et al.*, 1996). HeLaRDB weisen neben der erhöhten Daunorubicinresistenz auch Kreuzresistenzen gegenüber Vincristin, Etoposid, Paclitaxel und Mitoxantron auf - typischen Substraten dieses ABC-Transporters (siehe Resistenzfaktoren, Tab. 8). Damit wurde die Daunorubicin-induzierte MDR1-Überexpression als kausaler Faktor für den generierten MDR-Phänotyp in der *multidrug*-resistenten Zervixkarzinomzelllinie HeLaRDB identifiziert und ein neues, hinsichtlich seiner MDR-Charakteristika definiertes, *in vitro* Modell etabliert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen auch das klinische Problem einer Überexpression von MDR1/P-gp in Tumorzellen und der Auswahl geeigneter Zytostatika zur Behandlung *multidrug*-resistenter Tumoren. Zur Überwindung der MDR1/P-gp bedingten, klassischen *Multidrug*-Resistenz werden in der Klinik oft pharmakologisch aktive Substanzen, sog. MDR-Modulatoren (z.B. Verapamil), eingesetzt. Diese sind kritisch zu beurteilen, da sie in der zur Hemmung von MDR1/P-gp erforderlichen Dosierung eine nicht unerhebliche Toxizität haben und Tumorzellen gegen MDR-Modulatoren zudem tertiäre Resistenzen ausbilden können. Das heißt, dass Tumorzellen neben der intrinsischen/primären und gegen Zytostatika erworbenen/sekundären auch gegen MDR-Modulatoren Resistenzmechanismen entwickeln können und die Tumormasse anwächst. Aufgrund dieser Problematik ist es von grundlegender Bedeutung alternative Strategien zu erforschen, die *Multidrug*-Resistenz von Tumorzellen zu überwinden. Als eine vielversprechende Alternative gilt der gentherapeutische Ansatz, MDR-assoziierte Gene in ihrer Expression therapiebegleitend selektiv auszuschalten. Im Fokus der vorgelegten Forschungsarbeit steht dabei das Transkript des ABC-Transporters MDR1/P-gp.

Unter Anwendung von RNA-Technologien kann dieses Transkript endonukleolytisch gespalten und die Biosynthese dieses ABC-Transporters und der Auswärtstransport verschiedenster Zytostatika gestoppt werden. Neben der Auswahl einer selektiv gentherapeutisch wirksamen RNA-Technologie wie der RNA-Interferenz (RNAi, siehe 3.4), limitiert aber hauptsächlich der ausreichend effiziente Transport des therapeutisch wirksamen genetischen Materials in die gewünschte Zielzelle den Erfolg einer Gentherapie. Wegen ihrer E1-Deletion ($\Delta E1$) nicht replizierende Adenovirusvektoren sind aufgrund ihres geringen Gefährdungspotentials, ihrer Stabilität und der Möglichkeit hohe Titer zu erzeugen, sehr gut für den Transfer von therapeutisch wirksamen Nukleinsäuren in der Gentherapie geeignet. Dies wird von der Tatsache belegt, dass aktuelle klinische Gentherapiestudien das Adenovirus als Vektor für den Transfer von gentherapeutisch wirksamen Nukleinsäuren favorisieren (Stand Januar 2007). Deshalb wurden innerhalb der vorliegenden Arbeit adenovirale Vektoren entwickelt, die über den RNA-Interferenz-Mechanismus den für die klassischen MDR-Phänotyp verantwortlichen ABC-Transporter MDR1/P-gp spezifisch inhibieren.

5.2 Bewertung der anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren

Allen konstruierten Adenoviren wurde die E1-Deletion und damit ihre Replikationsinkompetenz nachgewiesen. Nach deren Internalisierung in die Tumorzelle, werden die ins adenovirale Genom integrierten anti-MDR1 shRNA Expressionskassetten unter der Kontrolle eines RNA-Polymerase III-abhängigen Promotors transkribiert, ohne dass sich die Adenoviren vermehren dürften. Die anti-MDR1 shRNA Expressionskassetten wurden so konstruiert, dass sich nach deren Transkription 19 zur MDR1 mRNA komplementäre Basen am 5'-Ende mit 19 dazu komplementären Basen am 3'-Ende paaren und sich eine ungepaarte Schleife (*loop*) in der Mitte der Sequenz ausbildet. Die effiziente Expression der verschiedenen im adenoviralen Genom integrierten anti-MDR1 shRNAs bzw. die vom *Dicer* intrazellulär prozessierten anti-MDR1 siRNAs (19 nt) konnten sequenzspezifisch nachgewiesen werden. Um einen optimalen posttranskriptionellen *knock down* von MDR1 zu erzielen, wurden zwei unterschiedliche Zielsequenzen auf der mRNA, zwei verschiedene *loop*-Längen sowie zwei verschiedene RNA-Polymerase III-abhängige Promotoren (H1 und U6) untersucht.

In vivo können H1- als auch U6-Promotor die Expression von 5S rRNA, tRNA, U6 snRNA und anderer kleiner stabiler RNA-Moleküle, die in bei der RNA-Prozessierung involviert sind, bewirken (Paule und White, 2000), da die zelluläre RNA-Polymerase III beide Promotoren erkennt und über eine hohe Transkriptionsrate von $\sim 1\text{-}4 \times 10^5$ Transkripte pro Zelle verfügt (Kappel *et al.*, 2006). In der Literatur werden die Effizienzen von H1- *versus* U6-Promotor wiederholt diskutiert. Die H1- und U6-vermittelte Transkription von shRNAs ist beispielsweise in HEK-293A-Zellen in ihrer Effizienz beinahe identisch (Hao *et al.*, 2005), in primären humanen Lymphozyten zeigte sich der U6-Promotor als vorteilhafter (An *et al.*, 2006). Die Effizienz jedes RNA-Polymerase III-abhängigen Promotors kann offensichtlich zelltypabhängig sein. In den Untersuchungen zur Eignung beider Promotoren für eine leistungsfähige anti-MDR1 RNAi in unterschiedlichen humanen Tumorzelllinien, wurden deshalb zwei verschiedene anti-MDR1 shRNAs (MDR-A und MDR-D) *downstream* eines H1- oder U6-Promotors in das adenovirale Genom integriert. Die so konstruierten Adenoviren wurden als Ad5H1/MDR-A bzw. Ad5U6/MDR-A und Ad5H1/MDR-D bzw. Ad5U6/MDR-D bezeichnet. Die Ergebnisse der Northern Blot Analysen drei Tage nach Infektion mit den *per se* wenig wirksamen Ad5H1/MDR-A bzw. Ad5U6/MDR-A zeigen eine geringe Überlegenheit des H1-Promotors anti-MDR1 RNAi zu triggern. Ad5U6/MDR-D, in dem die

U6-Promotor kontrollierte Variante der anti-MDR1 shRNA Expressionskassette MDR-D integriert wurde, zeigte vergleichbare Effekte wie dessen H1-Promotor kontrollierte Variante Ad5H1/MDR-D und erzielte fünf Tage nach Infektion ebenfalls eine deutliche Repression der MDR1 mRNA einer *multiplicity of infection* (MOI) von 2. Zusammenfassend zeigen die vorgelegten Daten eine etwa gleich hohe Effizienz beider Promotoren an, d.h. die Art des RNA-Polymerase III-abhängigen Promotors hat in den untersuchten Tumorzelllinien keinen Einfluss auf das Design adeonviral-basierter RNAi Strategien gegen MDR1/P-gp.

Ausschlaggebender für eine spezifische und effiziente Inhibition der MDR1-Expression ist jedoch die Konstruktion der shRNA an sich, d.h. die Auswahl der Zielsequenz auf dem MDR1 Transkript sowie die *loop*-Länge, die *sense* und *antisense* Zielsequenz miteinander verbindet (Abb. 6), sind um ein vielfaches bedeutender. Zwei bereits für die siRNA-Applikation (Nieth *et al.*, 2003) evaluierte Zielsequenzen auf der MDR1 mRNA wurden untersucht.

- MDR-A (nt-Positionen 499-517) wurde bezüglich der Literaturempfehlungen selektiert (Elbashir *et al.*, 2001; Harborth *et al.*, 2001). Die adenovirale Expression des anti-MDR1 shRNA MDR-A zeigte im direkten Vergleich zu den anderen beiden untersuchten Konstrukten MDR-C und MDR-D eine ausgeprägte MDR1 inhibitorische Aktivität erst ab einer MOI von 50. Bei dieser Virusdosis beginnt bereits der zytopathische Effekt (CPE) in beiden untersuchten Tumorzelllinien – eine virusverursachte morphologische Veränderung der infizierten Zelle. Eine Differenzierung zwischen virusbedingter Deformation der Tumorzelle und der spezifischen adenoviral vermittelten anti-MDR1 shRNA Expression und damit MDR1/P-gp Inhibition ist somit nicht möglich. Aus diesem Grund kommen beide Viren (Ad5H1/MDR-A und Ad5U6/MDR-A) für einen erfolgreichen gentherapeutischen Ansatz nicht in Frage. Ein mögliche Erklärung für die geringe Effektivität von MDR-A ist die starke Sekundärstruktur innerhalb seiner Zielsequenz auf der mRNA von MDR1 (*in silico*-Analysen, Daten nicht gezeigt). Zudem beginnt die Zielsequenz von MDR-A 77 nt unterhalb des Startkodons – hier können sich zahlreiche regulatorische Proteinbindungsstellen befinden, die eine effiziente Anlagerung des siRNA/RISC*-Komplexes an die MDR1-mRNA möglicherweise verhindern.
- MDR-C und MDR-D interagieren zwar mit der gleichen MDR1 mRNA Zielsequenz (eine ausführlich analysierte anti-MDR1 *Hammerhead* Ribozym Schnittstelle, Holm *et al.*, 1994; nt-Positionen 3051-3069), die *hairpin*-Struktur ihrer durch Polymerase III

Promotoren abgelesenen shRNAs unterscheiden sich aber in der Länge der *loop*-Sequenz (MDR-C: 9 nt *loop*, MDR-D: 5 nt *loop*). Dies erlaubte die Untersuchung, ob *stem-loop*-Konstrukte unterschiedlicher Länge und Stabilität einen Einfluss auf die Effizienz der Entstehung von siRNA-Molekülen ausüben. Mit der Konstruktion des Adenovirus' Ad5U6/MDR-C konnte nämlich im Gegensatz zu Ad5U6/MDR-D ein hoch effizienter anti-MDR1 RNAi vermittelnder Vektor etabliert werden. Bereits mit extrem geringen Virusdosen (MOI 1 bis MOI 5) kann fünf Tage nach Infektion die MDR1 mRNA, als auch das Protein MDR1/P-gp auf ein nicht detektierbares Niveau inhibiert werden. Interessanterweise hat die *loop*-Sequenz demnach einen entscheidenden Einfluss auf die Effizienz der transkribierten shRNAs. Wie die Ergebnisse mit Ad5U6/MDR-D zeigen, kann die transkribierte shRNA MDR-D (5 nt *loop*) an die Effizienz von Ad5U6/MDR-C (9 nt *loop*) nicht heranreichen. Bereits die MDR1 Northern Blot Analysen zeigen eine starke Repressionsaktivität von Ad5U6/MDR-D erst ab MOI 10, Western Blot Analysen bestätigen den Unterschied.

Die in der Literatur vorgefundene Datenlage bezüglich der *loop*-Fragestellung ist widersprüchlich. Brummelkamp *et al.* (2002) zeigten, dass ein 9 nt *loop* höhere Effekte zeigt, als ein 7 nt oder 5 nt *loop*. Alternative Studien belegen, dass sehr kurze *loop*-Strukturen, einschließlich 3 und 5 nt *loops*, keine geringeren shRNA Effekte vermittelten, als längere *loops* (Jaque *et al.*, 2002; McM Magnus *et al.*, 2002). Andere Untersuchungen auch mit den in dieser Arbeit untersuchten Tumorzelllinien ergaben, dass auch mit *loop*-Längen von 5, 7, 9 und 11 nt kein Einfluss auf die biologische Aktivität von shRNA Molekülen detektiert werden kann (Materna *et al.*, 2006; Pribsch *et al.* 2006). Doch innerhalb dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass Ad5U6/MDR-C (9 nt *loop*) eine effektivere Repression von MDR1/P-gp erreicht, als Ad5U6/MDR-D (5 nt *loop*), obwohl beide shRNAs unter der Kontrolle des gleichen Promotors stehen und aus beiden shRNAs gleiche anti-MDR1 siRNAs generiert werden. Diese Daten implizieren für einen potentiellen gentherapeutischen Ansatz, dass der *loop* bedacht werden sollte und die ideale *loop*-Sequenz nur jeweils empirisch ermittelt werden kann.

5.2.1 Funktionelle Untersuchungen der infizierten Tumorzellen

5.2.1.1 Akkumulationsverhalten der infizierten Tumorzellen

Nach den starken Effekten der adenoviral exprimierten anti-MDR1 shRNAs auf die Expression der MDR1 kodierenden mRNA und des korrespondierenden Proteins MDR1/P-gp, wurde die gehemmte biologische Aktivität dieses ABC-Transporters untersucht. Die Akkumulationsmessungen verdeutlichten zum einen die hohe Effektivität von Ad5U6/MDR-C und zum anderen die adenovirus-dosisabhängig gesteigerte Akkumulationsrate von Daunorubicin in beiden MDR-Zellmodellen. MOI 10 (EPP85-181RDB) bzw. MOI 20 (EPG85257RDB) waren von Ad5U6/MDR-C ausreichend, um die gleiche intrazelluläre Akkumulation wie in den entsprechenden Zytostatika-sensitiven, parentalen Varianten zu forcieren. Sehr viel geringere Effekte auf die Daunorubicin-Akkumulation erzielte Ad5U6/MDR-D (18 % Steigerung der Akkumulation in EPG85-257RDB und 14 % in EPP85-181RDB). Ad5U6/LacZ beeinflusste weder die Expression, noch die Pumpaktivität von MDR1/P-gp und beweist damit die Spezifität der analysierten anti-MDR1 shRNAs. Diese Daten bestätigen die hohe Effizienz des Adenovirus Ad5U6/MDR-C, welches eine vollständige Inhibition der biologischen Aktivität der MDR1/P-gp Effluxpumpe vermittelt.

5.2.1.2 Resistenzverhalten der infizierten Tumorzellen

Die Inhibition der MDR1/P-gp Expression und der damit verbundenen Unfähigkeit der Zelle das Zytostatikum herauszupumpen, müsste als Resultat zu einer Resensitivierung der Tumorzelle gegenüber des spezifischen Zytostatikums führen. Die adenoviral infizierten Tumorzellen wurden deshalb hinsichtlich ihrer Resistenzeigenschaften gegen die von MDR1/P-gp transportierten Zytostatika Daunorubicin und Vincristin getestet. Als Maßstab für die Bewertung der Resistenz diente der IC₅₀-Wert des jeweiligen Zytostatikums (Fricker and Buckley, 1996; Voigt, 2005). Da die Zytotoxizitätsassays aufgrund ihres experimentellen Aufbaus einen längeren Zeitraum beanspruchen als Akkumulationsassays, wurden geringere Virusdosen verwendet, um einer vom zytopathischen Effekt bedingten Verfälschung des Tests vorzubeugen. Deshalb wurden nur 50 % der Virusdosen eingesetzt, die zu einer vollständigen Hemmung der MDR1/P-gp Pumpaktivität führen, d. h. MOI 5 in der Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB und MOI 10 in der Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB. Gemäß der Daunorubicin-Akkumulationsassays sollten diese Virusdosen eine 80 %ige Inhibition in der *multidrug*-resistenten Pankreaskarzinomzelllinie EPP85-181RDB und 53 % in der *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB erzielen. Das bedeutet,

dass die EPP85-181RDB eine MDR1/P-gp Restaktivität von 20 % und die EPG85-257RDB von 47 % aufweisen sollten. In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnte mit den verringerten Virusdosen von Ad5U6/MDR-C eine Reversion des *Multidrug*-Resistenz Phänotyps gegenüber Daunorubicin zu 87 % in den Pankreaskarzinomzellen und zu 66 % in den Magenkarzinomzellen erreicht werden. Auch konnte die Vincristin-Resistenz in beiden *multidrug*-resistenten Tumorzelllinien fast vollständig aufgehoben werden (96 % bzw. 82 %). Vergleichende Zytotoxizitätsassays mit Ad5U6/LacZ, welches keinen Einfluss auf das Resistenzverhalten der MDR-Zellmodelle hatte, sowie die Behandlung der Tumorzellen mit Cisplatin, dass von MDR1/P-gp nicht transportiert werden kann, bestätigten erneut die Spezifität von Ad5U6/MDR-C. Folglich könnte Ad5U6/MDR-C als ein effizienter gentherapeutischer Vektor zur vollständigen Inhibition der biologischen Aktivität der MDR1/P-gp Effluxpumpe eingesetzt werden.

5.3 Ad5U6/MDR-C als Gentherapievektor

Mit Ad5U6/MDR-C wurde ein hoch effizienter Transfer von anti-MDR1 shRNAs bereits mit extrem niedrigen Virusdosen nachgewiesen. Im Hinblick auf eine klinische Applikation mit Ad5U6/MDR-C zur selektiven MDR1/P-gp Inhibition könnten sich Probleme ergeben, die mit der physiologischen Funktion dieser Effluxpumpe zusammenhängen. Eine hohe MDR1/P-gp Expression findet sich im Transportepithelium von Leber (Thiebaut *et al.*, 1987; Ros *et al.*, 2003; Chandra and Browner, 2004), Niere und gastrointestinalen Trakt (Thiebaut *et al.*, 1987), in pharmakologischen Barrieren wie der Blut-Hirn-Schranke (Dombrowski *et al.*, 2001) und in adulten Tumorstammzellen (Dean *et al.*, 2005). Das bedeutet für die klinische Situation, dass die Applikation von shRNA exprimierenden, MDR1/P-gp inhibierenden Vektoren auf *multidrug*-resistente Tumorzellen beschränkt bleiben sollte. Eine vielversprechende Strategie ist die intratumorale Applikation des innerhalb dieser Arbeit entwickelten Adenovirus Ad5U6/MDR-C in Begleitung einer konventionellen Chemotherapie. Diese einleitend besprochene *in situ*-Therapie wird in klinischen Studien bevorzugt, da der Hauptteil der injizierten Adenoviren in einem systemischen Ansatz nur die Kupffer-Zellen in der Leber infizieren würde (Worgall *et al.*, 1997) und Ad5U6/MDR-C als Vertreter des Serotyps 5 (Ad5) primär über den Coxsackie/Adenovirus-Rezeptor (CAR) gebunden wird. Aus diesem Grunde ist es innerhalb des adenoviralen Gentherapieansatzes von zentraler Bedeutung ein CAR-Expressionsprofil von Tumorzellen zu erstellen. Deshalb wurde für die innerhalb dieser Arbeit genutzten MDR-Tumorzellmodelle eine Methode auf

Basis der quantitativen RT-PCR etabliert, die CAR-Expression zu untersuchen, denn die CAR-mRNA-Expression lässt auf die CAR-Proteinexpression rückschließen (Graat *et al.*, 2005).

Die *multidrug*-resistenten HeLaRDB bzw. EPG85-257RDB haben gegenüber ihren parentalen Ausgangszelllinien eine signifikant erhöhte CAR-Expression (2-fach bzw. 5-fach) und können somit auch mit steigender Wahrscheinlichkeit infiziert werden, um einen effizienten adenoviralen Transfer von anti-MDR1 shRNAs zu gewährleisten, was dem hier gewählten adenoviralen Gentherapieansatz entgegenkommt.

Zwischen den Tumorentitäten variiert die CAR-Expression und kann therapiebegleitend zum Beispiel durch Topotecan, Etoposid oder Histon-Deacetylase Inhibitoren wie Trichostatin A positiv moduliert werden (Hemminki *et al.*, 2003; Bieler *et al.*, 2006). Prostata- und Mammakarzinom weisen gegenüber Normalgewebe eine *per se* signifikant erhöhte CAR-Expression auf (Rauen *et al.*, 2002; Martin *et al.*, 2005).

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass ein adenoviral-basierter RNAi-Ansatz mit Ad5U6/MDR-C so hoch effektiv sein kann, um selbst in extrem stark Zytostatika-resistenten Zellmodellen eine Reversion der MDR1/P-gp vermittelten *Multidrug*-Resistenz zu erreichen. Zudem könnte eine solch effiziente gentherapeutische Strategie nicht nur für die adjuvante Chemotherapie, sondern und auch für Prävention der MDR in humanen malignen Tumoren innerhalb eines neoadjuvanten Therapieansatzes angewendet werden.

5.4 Replikation von Δ E1-Adenoviren

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion zwischen adenoviral vermittelter Gentherapie und Chemotherapie lassen deutlich erkennen, dass multiple Wechselwirkungen zwischen beiden Therapiemodalitäten zu erwarten sind. Als eine erhebliche Nebenwirkung kann man die Replikation von eigentlich replikationsinkompetenten Adenovirusvektoren bezeichnen.

Allen innerhalb dieser Arbeit konstruierten Adenoviren fehlt die E1-Region. Da viele der frühen adenoviralen Genprodukte (E1, E2, E3 und E4) kaskadenartig hintereinandergeschaltet sind, werden die Genprodukte der E1-Region im viralen Lebenszyklus am frühesten exprimiert und sind für die virusvermittelte Transformation von gesunden Zellen und für die Transaktivierung der anderen viralen Gene entscheidend (Berk *et al.*, 2005). Fehlt die E1-

Region ($\Delta E1$) wird diese Kaskade bereits zu Beginn gestoppt, was $\Delta E1$ -Adenoviren zu relativ sicheren und zu den aktuell am häufigsten genutzten Gentherapievektoren macht.

Holm *et al.* stellten 2004 dar, dass *multidrug*-resistente Tumorzellen eine E1-unabhängige adenovirale Replikation ermöglichen können, was bedeutet, dass gewöhnliche $\Delta E1$ -Adenoviren ein bisher verkanntes onkolytisches Potential tragen und selektiv MDR-Tumorzellen eliminieren können. Auch das E1-deletierte Virus Ad5U6/MDR-C bedingt ab einer MOI von 50 einen stark ausgeprägten zytopathischen Effekt (CPE) selektiv in *multidrug*-resistenten Tumorzellen, wie die CPE-Assays am Beispiel der MDR1/P-gp überexprimierenden Zervixkarzinomzelllinie HeLaRDB zeigen.

In parentalen HeLa erfolgt dagegen keine Replikation der adenoviralen DNA von $\Delta E1$ -Adenoviren - nur für das Wildtyp-Adenovirus (Ad5/Wt) konnte dort eine effiziente Replikation durch Detektion der adenoviralen E2A-Expression mittels Southern Blot Hybridisierung nachgewiesen werden. Dagegen unterstützen die MDR-Modellzelllinien EPP85-181RDB und EPG85-257RDB eine ausgeprägte adenovirale DNA-Synthese aller konstruierten $\Delta E1$ -Adenovirusvektoren, obwohl für diese die E1-Deletion nachgewiesen wurde. Allerdings unterstützen die *multidrug*-resistenten Pankreaskarzinomzellen eine deutlich geringere Virus-DNA-Replikation als die EPG85-257RDB. Dies kann mit der in den EPP85-181RDB detektierten niedrigeren CAR-Expression in Zusammenhang gebracht werden. Je weniger Coxsackie/Adenovirus Rezeptor eine Tumorzelle exprimiert, desto weniger Viren können internalisiert werden (Russell, 2000) und damit auch replizieren.

Das bedeutet für einen Gentherapieansatz mit dem $\Delta E1$ -deletierten Adenovirus Ad5U6/MDR-C, dass es selektiv in *multidrug*-resistenten Tumorzellen replizieren kann – was von Vorteil ist, da es durch seine anti-MDR1 shRNA Expression genau gegen diesen MDR-Phänotyp wirksam ist und damit selektiv onkolytisch fungiert, in dem es einen Angriffspunkt für eine erfolgreiche Chemotherapie von *multidrug*-resistenten Tumorzellpopulationen gewährleistet. Weil das größte Manko der Tumorgentherapie der geringe Transfer der gentechnisch wirksamen Nukleinsäuren ist, ging man auch in klinischen Studien dazu über, replikationskompetente Adenoviren einzusetzen, um eine höhere Transduktionseffizienz zu erreichen (Heise *et al.*, 1999; Ichikawa und Chiocca, 2001). Dies braucht in vorliegendem Gentherapieansatz demnach nicht in Betracht gezogen werden, da Ad5U6/MDR-C nur selektiv in MDR-Tumorzellen repliziert. Trotzdem wird so die Sicherheit dieses Vektors unterlaufen.

5.4.1 HU-Chemotherapie fördert die Effizienz der Ad-Gentherapie

Eine Möglichkeit, die adenovirale Replikation aus Gentechniksicherheitsgründen zu unterbinden, ist die Behandlung mit Hydroxyurea (HU, Litalir®), welches auch als Chemotherapeutikum z.B. bei der Behandlung von Chronischer Myeloischer Leukämie erfolgreich angewendet wird. Hydroxyurea inhibiert die Ribonukleotid-Reduktase innerhalb der infizierten Tumorzellen und unterbindet die DNA-Synthese (Krakoff *et al.*, 1968). Das bedeutet für das Adenovirus, dass der Übergang von der frühen zur späten Replikationsphase verhindert wird.

HU bedingt dadurch eine Verlängerung der frühen adenoviralen Transkriptionsphase die Akkumulation von frühen Transkripten innerhalb des Zellkerns (Timpe *et al.*, 2006). Auch Huang *et al.* (2005) zeigten, dass eine Behandlung mit Hydroxyurea die adenovirus-vermittelte Genexpression in Tumorzellen signifikant steigern kann.

Innerhalb dieser Arbeit wurde auf Basis der DNA- und mRNA-Expression des späten E2A-Gens (E2A_{late}) bestätigt, dass die adenovirale Replikation von Δ E1-Adenoviren in den MDR-Tumormodellen HeLaRDB, EPP85-181RDB und EPG85-257RDB mittels HU fast vollständig inhibiert werden kann. Wegen der gehemmten Replikation entstehen keine neuen Adenovirus-Nachkommen, die den anti-MDR1 RNAi-Effekt potenzieren könnten.

Die anti-MDR1 Effizienz von Ad5U6/MDR-C wurde durch Hydroxyurea jedoch nicht eingeschränkt, sondern sogar erhöht (+5 % in HeLaRDB, +12 % in EPG85-257RDB). Durch die Hydroxyurea-bedingte Verlängerung der frühen adenoviralen Phase wird die anti-MDR1 shRNA Expressionskassette demnach vermehrt transkribiert und potenziert somit den anti-MDR1 RNAi Effekt auf Transkriptionsebene, ohne dass das Virus repliziert.

Diese Ergebnisse verdeutlichen die möglichen Interaktionen zwischen adenoviral vermittelter Gentherapie und Chemotherapie mit Hydroxyurea in der Krebsbehandlung und ermöglichen die Entwicklung neuer Strategien für einen kombinierten Ansatz, um die sicherheitstechnisch fragwürdige Fähigkeit der *multidrug*-resistenten Tumorzellen die Replikation von Δ E1-Adenoviren zu unterstützen, einerseits zu unterbinden und gleichzeitig die Effizienz der anti-MDR1 shRNA Transkription auszuweiten. Dies kann von besonderem Interesse sein, wenn in der klinischen Phase die wiederholte Administration mit anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren genutzt wird und damit ein Maximum an Effizienz aus der initialen Virusdosis erzielt werden kann.

Jedoch verblieb die Frage nach dem Ursprung des Phänomens, dass *multidrug*-resistente Tumorzellen die Replikation replikationsinkompetenter ($\Delta E1$) Adenoviren unterstützen und sich damit von ihren Zytostatika-sensitiven Ausgangszellen abzugrenzen. Wie die vorliegenden Forschungsergebnisse verdeutlichen, kann dem Y-Box Protein 1 (YB-1) wegen seines besonderen Expressionsprofils in *multidrug*-resistenten Tumorzellen eine tragende Rolle zugewiesen werden.

5.5 Das Y-Box Protein 1

5.5.1 Bedeutung von YB-1 in MDR-Tumoren

Die Forschung der vergangenen Jahre hat viele Daten zusammengetragen, die die Bedeutung von YB-1 auch für die Tumorbilogie unterstreichen. YB-1 wird aktiviert als Antwort auf genotoxischen Stress (Ohga *et al.*, 1996; Koike *et al.*, 1997) und ist assoziiert mit *Multidrug*-Resistenz (Ohga *et al.*, 1998). Das YB-1 Proteinlevel (Janz *et al.*, 2002), als auch dessen nukleäre Lokalisierung (Shibahara *et al.*, 2001) haben prognostische Eigenschaften in verschiedenen Tumoren. Zudem werden tumorassoziierte Gene und zelluläre Reparaturmechanismen durch YB-1 reguliert.

Ursprünglich wurden Y-Box-Proteine auf Grund ihrer DNA-Bindungsaktivität als nukleäre Proteine beschrieben. Das Vorkommen von möglichen Kernlokalisierungssignalen in der Primärsequenz der Y-Box-Proteine sowie der Einfluss auf die Transkription verschiedener Gene unterstützten diese Vermutung (Didier *et al.*, 1988). Dass Y-Box-Proteine auch im Zytoplasma zu finden sind, ergaben unter anderem Untersuchungen von Jürchott *et al.* (2003), in denen eine Abhängigkeit der subzellulären Lokalisation von YB-1 in kultivierten HeLa-Zellen vom Verlauf des Zellzyklus nachgewiesen werden konnte. Während eine zytoplasmatische Lokalisation von YB-1 zu jeder Phase des Zellzyklus beobachtet werden konnte, wurde eine zusätzliche nukleäre Lokalisation nur in den Zellen nachgewiesen, die sich im Übergang von der G1- in die S-Phase befanden.

Wie die in vorliegender Arbeit durchgeführten immunzytochemischen Untersuchungen der Tumorzellmodelle HeLa / HeLaRDB und EPG85-257P / EPG85-257RDB zeigen, weist die jeweils *multidrug*-resistente, MDR1/P-gp positive Variante im Vergleich zu ihrer parentalen Tumorzellpopulation eine erhöhte Expression und stabile nukleäre Akkumulation des Proteins YB-1 auf. Dagegen verhält sich die YB-1 mRNA Expression gegenteilig, wie die quantitativen RT-PCR Analysen belegen. In den Magenkarzinomzelllinien liegt die relative YB-1 mRNA Expression der *multidrug*-resistenten Variante 30 % unter der der parentalen.

Eine verlängerte Halbwertszeit der mRNA oder des Proteins YB-1 kommen als mögliche Erklärung in Frage, worüber aber bisher keine verlässlichen Daten existieren. Durch Zytostatikagabe kann aber beispielweise die Halbwertszeit der MDR1 mRNA in HepG2-Zellen (Leber) von 8 h auf > 20 h (Prokipcak *et al.*, 1999) bzw. in K562-Zellen (Myeloische Leukämie) von 1 h auf 10 h (Yague *et al.*, 2003) gesteigert werden. Auch wurde z.B. für p53 beschrieben, dass seine Halbwertszeit von der zellulären Umgebung abhängt (Hengstermann *et al.*, 1998). Diese erklärt freilich nicht die Kernakkumulation von YB-1 in Tumorzellen mit MDR1/P-gp Überexpression, verdeutlicht aber die durch ihren MDR-Phänotyp bedingte Deregulation von Tumorzellen.

Während der Etablierung der *multidrug*-resistenten HeLaRDB aus der Zervixkarzinomzelllinie HeLa wurden diese mit einer ansteigenden Konzentration von Daunorubicin inkubiert, um MDR1/P-gp aufzuregulieren. Aufgrund der planaren Ringsysteme interkaliert Daunorubicin in Nukleinsäuren und hemmen die RNA- und DNA-Synthese. Ein Resultat dieser zahlreichen DNA-Schäden ist die Blockierung des Zellzyklus, vor allem in der späten S-Phase. Auch lokalisiert sich YB-1 in der S-Phase in den Zellkern – so könnten sich während der Etablierung von Tumorzellen mit MDR-Phänotyp die MDR1/P-gp Expression und die Kernlokalisation von YB-1 gleichzeitig vollziehen und sich bedingen. Auch in verschiedenen Veröffentlichungen wurde eine mögliche Beteiligung von YB-1 an der Regulation von MDR1 diskutiert (Goldsmith *et al.*, 1993; Bargou *et al.*, 1997; Ohga *et al.*, 1998; Janz *et al.*, 2002; Saji *et al.*, 2003; Oda *et al.*, 2003), da der Promotor des *MDR1*-Gens neben einer Reihe von Erkennungssequenzen für verschiedene Transkriptionsfaktoren auch ein Y-Box-Motiv enthält und ein minimales Promotorfragment, dass diese Y-Box und eine GC-Box enthält, ausreichend ist, um in Transfektionsexperimenten die volle Promotoraktivität zu erreichen (Goldsmith *et al.*, 1993).

Um das Verhältnis zwischen YB-1- und MDR1/P-gp- Expression genauer zu analysieren, wurde die induzierbar YB-1 inhibierende *multidrug*-resistente Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB/antiYB-1 genutzt. In deren Genom wurde eine Doxycyclin-induzierbare anti-YB-1 shRNA Expressionskassette integriert (Müller, 2005). Das induzierbare System wurde ausgewählt, da ein *antisense*-RNA vermittelter *knock down* von YB-1 in Melanom-, Adenokarzinom-, Fibrosarkom- und Darmkrebszellen deren Zelltod bewirkte, weil p53 gleichzeitig aufreguliert wurde (Lasham *et al.*, 2003) und YB-1 ein essentielles Protein zur Stabilisierung von zellulären mRNAs ist.

Während eines Langzeitversuches, in dem die in die EPG85-257RDB integrierte anti-YB-1 shRNA-Expressionskassette dauerhaft aktiviert wurde, konnten die Ergebnisse von Lasham *et al.* (2003) innerhalb dieser Arbeit untermauert werden. Nach durchschnittlich 10 Tagen RNAi-vermittelter YB-1 Inhibition wurde eine apoptotische Morphologie beobachtet. In beiden Magenkarzinomzelllinien konnte eine YB-1 Inhibition von über 90 % auf mRNA- als auch Protein-Ebene über einen Zeitraum von max. 20 Tagen erreicht werden. Allerdings konnte in der *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzelllinie EPG85-257RDB auch nach 20 Tagen YB-1 Repression keine Veränderung der MDR1 mRNA Expression detektiert werden. Das bedeutet natürlich nicht, dass YB-1 während der Entwicklung einer resistenten Tumorzellpopulation keine Rolle spielt – für die Aufrechterhaltung des *Multidrug*-Resistenz-Phänotyps scheint die regulative Aktivität von YB-1 aber nicht notwendig zu sein. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass die Nutzung von YB-1 als prognostischen Marker für bereits formierte Zytostatika-resistente Tumorzellpopulationen fraglich ist.

Ein interessanter Forschungsansatz, um diese Fragestellungen zu adressieren, ist die Integration der gesamten MDR1/P-gp kodierenden cDNA (~4,5 kb) in das Genom von Zytostatika-sensitiven (Tumor-)Zellen. So können z.B. MDR1/P-gp überexprimierende humane Tumorzellklone ohne Zytostatikagabe etabliert werden, die auf ihren YB-1 Status hin analysiert und mit den durch Zytostatika-Exposition hergestellten MDR1-Tumorzellen verglichen werden können. Auch für weiterführende funktionale MDR1/P-gp-Untersuchungen können solche Zellklone verwendet werden (derzeitige Arbeiten d. Verf.).

Doch verblieb die Frage nach dem Ursprung des Vermögens *multidrug*-resistenter Tumorzellen, selektiv die Replikation Δ E1-Adenoviren zu unterstützen und sich damit von ihren parental *multidrug*-sensitiven Ausgangszellen abzugrenzen.

5.5.2 Bedeutung von YB-1 in der adenoviralen Gentherapie von MDR-Tumoren

Bereits 2002 entdeckten Holm *et al.*, dass sich der Transkriptionsfaktor YB-1 in adenoviral infizierten Zellen in den Zellkern lokalisiert und evtl. dadurch die adenovirale E2-Genexpression und damit eine Adenovirusreplikation ermöglicht. Dem daraufhin konstruierten Adenovirus (AdYB-1) wurde YB-1 als Transgen integriert und obwohl es keine E1-Region enthält, war es so zur Replikation befähigt. Die adenovirale Expression von YB-1 kann demnach die E1-Deletion kompensieren. Es blieb aber offen, inwiefern das zelluläre YB-1 in *multidrug*-resistenten Tumorzellen Auswirkungen auf eigentlich nicht replizierende Adenoviren hat.

Mit den induzierbar YB-1 inhibierenden Zytostatika-sensitiven EPG85-257P/antiYB1 und *multidrug*-resistenten EPG85-257RDB/antiYB1 konnte nun erstmals auch diese Fragestellung adressiert werden. Die in dieser Arbeit vorliegenden Ergebnisse beschreiben den entscheidenden Einfluss der zellulären Expression und Lokalisation von YB-1 auf die Replikation von nachweislich replikationsinkompetenten (Δ E1) adenoviralen Gentherapievektoren in *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzellen.

Eine adenovirale Infektion erhöhte einerseits die zelluläre YB-1 mRNA Transkription um durchschnittlich 50 %, was bestätigt, dass YB-1 auf exogene Stressstimuli mit einer erhöhten Expression reagiert und die Bedeutung dieses Transkriptionsfaktors während der adenoviralen Replikation in *multidrug*-resistenten Tumorzellen unterstreicht.

Multidrug-resistente Tumorzellen weisen wie immunzytochemisch gezeigt andererseits eine erhöhte nukleäre Akkumulation von YB-1 auf. Die Transkription der von Ad5U6/MDR-C kodierten anti-MDR1 shRNA und dessen Replikation finden ebenfalls im Kern statt. Der Promotor des adenoviralen Gens *E2Alate*, welches maßgeblich an der Virusreplikation beteiligt ist (Swamynathan und Thimmapaya, 1995), besitzt drei Y-Boxen und damit drei potentielle Bindungsstellen für YB-1 (Goding *et al.*, 1987). Normalerweise wird der E2-Promotor u.a. durch das adenovirale Protein E1A transaktiviert (Swamynathan und Thimmapaya, 1996), aber Ad5U6/MDR-C fehlt die gesamte E1-Region. Deren Funktion kann aber durch die Integration des YB-1-Gens kompensiert werden (Holm *et al.*, 2002).

Aufbauend auf diese Forschungsergebnisse wurde die Hypothese entwickelt, dass Tumorzellpopulationen mit MDR-Phänotyp die Adenovirusreplikation aufgrund ihres veränderten YB-1 Status ermöglichen. Die vorliegenden Ergebnisse zeigen, dass aus einer

induzierten 90 %igen Inhibition von YB-1 in *multidrug*-resistenten Magenkarzinomzellen eine Hemmung der adenoviralen Replikation um 70 % resultiert.

Die gehemmte Replikation des als hoch effizient getesteten anti-MDR1 RNAi vermittelnden Adenovirus Ad5U6/MDR-C konnte nicht nur mit Hilfe der quantitativen RT-PCR, sondern auch durch Nachweis der funktionellen Adenovirus-Nachkommen (Virionen) mittels immunzytochemischer Färbungen bewiesen werden. Die gehemmte Adenovirus-maturation (*self assembly*) konnte zudem mit der reprimierten YB-1 Proteinexpression in Zusammenhang gebracht werden. Diese Daten deuten drauf hin, dass die Inhibition von YB-1 die Transkription des E2A_{late} Gens und damit die Adenovirusreplikation *in vitro* hemmt.

Darüber hinaus reduziert die gehemmte Replikation von Ad5U6/MDR-C die Effizienz der anti-MDR1 shRNA Transkription und damit die RNAi-vermittelte Inhibition des ABC-Transporters MDR1/P-gp um durchschnittlich 40 %.

Damit kann postuliert werden, dass die Effizienz von adenoviralen Vektoren in der gentherapeutischen Behandlung von *multidrug*-resistenten Tumoren abhängig von deren funktioneller YB-1 Expression ist und dass die selektive Adenovirusreplikation in *multidrug*-resistenten Tumorphpopulationen für einen Gentherapieansatz ausgenutzt werden kann, um Tumormasse mit MDR-Phänotyp mit anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren effizienter zu transduzieren, damit sie einer Chemotherapie wieder zugänglich wird und eliminiert werden kann. D.h. das selektiv onkolytische Verhalten von Ad5U6/MDR-C könnte für eine gezielte Behandlung *multidrug*-resistenter Tumoren eingesetzt werden.

Es muss daran erinnert werden, dass YB-1 in zellulären Reparaturmechanismen und bei der Stabilisierung von mRNAs eine tragende Rolle spielt. Bindet YB-1 nach der Infektion an die drei Bindungsstellen des adenoviralen E2_{late} Promotors um die Adenovirusreplikation zu ermöglichen, steht es für die z.B. durch Daunorubicin-Behandlung verursachten zellulären DNA-Reparaturen nicht mehr zur Verfügung, d.h. die durch die Chemotherapie verursachten zellulären Schäden können so weniger effizient repariert werden, was in einer höheren Toxizität des Zytostatikums und effizienter Eliminierung der Tumormasse resultieren kann. Es ist somit notwendig, das physiologischen Expressionsmuster von YB-1 in verschiedenen Tumoren systematisch zu bestimmen, wenn für deren Behandlung Δ E1-Adenoviren als Gentherapievektoren in Betracht kommen.

5.6 Ausblick

Die in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Interaktion zwischen adenoviral vermittelter Gentherapie *multidrug*-resistenter Tumorphpopulationen und konventioneller Chemotherapie mit Daunoblastin bzw. Hydroxyurea zur Eliminierung der Tumormasse mit klassischem MDR-Phänotyp einerseits und andererseits zur Effizienzsteigerung $\Delta E1$ -deletierter Adenovirusvektoren, lassen deutlich erkennen, dass multiple Wechselwirkungen zwischen den einzelnen Therapiemodalitäten zu erwarten sind. Auch wenn kombinierte Therapien bereits in einigen Fällen in präklinischen (Tiermodelle) und klinischen Studien eingesetzt worden sind, kann man nach den hier vorgestellten Daten erwarten, dass es bei der gentherapeutischen Behandlung von *multidrug*-resistenten Tumorphpopulationen zu multiplen Interaktionen und unter Umständen auch zu erheblichen Nebenwirkungen kommen könnte. Daher sind weitergehende Untersuchungen für die Etablierung geeigneter *in vitro* Modelle von großer Bedeutung, um den für die adenovirale Replikation von eigentlich replikationsinkompetenten Adenoviren offensichtlich entscheidenden Regulationsmechanismus von YB-1 zu verstehen (derzeitige Arbeiten d. Verf.). Wenn bekannt ist, welcher YB-1 Status auf die in der Gentherapie eingesetzten adenoviralen Vektoren erwünschte und auch möglicherweise unerwünschte Wirkungen im Hinblick auf das Therapieziel der spezifischen Eliminierung von Tumorzellpopulationen mit MDR-Phänotyp haben, wäre ein rationales Design zukünftiger Konstrukte und Kombinationstherapien möglich. Die Beantwortung dieser Fragen ist für den Einsatz kombinierter Therapien in klinischen Studien von großer Bedeutung. Aufgrund der oft wenig effizienten Transduktion von Tumorgewebe wegen geringer Expression des primären Rezeptors zur Adenovirusbindung (CAR), könnte z.B. eine Kombinationstherapie mit Trichostatin A durchgeführt werden, um CAR positiv zu modulieren (Bieler *et al.*, 2006). Auch könnte in der Therapie durch einen kombinierten Ansatz mit Hydroxyurea die selektiv onkolytische Wirkung von Ad5U6/MDR-C verbessert werden oder es werden gleich *per se* onkolytische Adenoviren als Gentherapievektoren eingesetzt, deren effiziente Replikation und Infektiosität auf das zu eliminierende Tumorgewebe begrenzt bleibt und zusätzlich mit anti-MDR1 shRNAs „bewaffnet“ werden (derzeitige Arbeiten d. Verf.).

6 Bibliographie

- Alahari SK., DeLong R., Fisher MH., Dean NM., Villet P., Juliano RL. (1998). Novel chemically modified oligonucleotides provide potent inhibition of P-glycoprotein expression. *J Pharmacol Exp Ther.* **286**, 419-428.
- Alvarez M., Paull K., Monks A., Hose C., Lee JS., Weinstein J., Grever M., Bates S., Fojo T. (1996). Generation of a drug resistance profile by quantitation of mdr-1/P-glycoprotein in the cell lines of the National Cancer Institute. *J. Clin. Invest.* **95**, 2205-2214.
- An, DS, Qin FX., Auyeung VC., Mao SH., Kung SK., Baltimore D., Chen IS. (2006). Optimization and functional effects of stable short hairpin RNA expression in primary human lymphocytes via lentiviral vectors. *Mol Ther.* **14**, 494-504.
- Anderson WF. (1998). Human gene therapy. *Nature* **392**, 25-30.
- Arceci RJ. (1993). Clinical significance of P-glycoprotein in multidrug resistance malignancies. *Blood* **81**, 2215-2222.
- Ashizuka M., Fukuda T., Nakamura T., Shirasuna K., Iwai K., Izumi H., Kohno K., Kuwano M., Uchiumi T. (2002). Novel translational control through an iron-responsive element by interaction of multifunctional protein YB-1 and IRP2. *Mol. Cell. Biol.* **22**, 6375-6383.
- Ausubel FM., Brent R., Kingston RE., Moore DD., Seidman JG., Smith JA., Struhl K. (1998). Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York.
- Baker CC., and Ziff E. (1981). Promoters and heterogeneous 5' termini of the messenger RNAs of adenovirus serotype 2. *J. Mol. Biol.* **149**, 189-221.
- Baker EK., Johnstone RW., Zalcberg JR., El-Osta A. (2005). Epigenetic changes to MDR1 locus in response to chemotherapeutic drugs. *Oncogene* **24**, 8061-8075.
- Baldini N., Scotlandi K., Barbanti-Brodano G., Manara MC., Maurici D., Bacci G., Bertoni F., Picci P., Sottili S., Campanacci M. (1995). Expression of P-glycoprotein in high-grade osteosarcomas in relation to clinical outcome. *N. Engl. J. Med.* **333**, 1380-1385.
- Bargou RC., Jurchott K., Wagener C., Bergmann S., Metzner S., Bommert K., Mapara MY., Winzer KJ., Dietel M., Dorken B., Royer HD. (1997). Nuclear localization and increased levels of transcription factor YB-1 in primary human breast cancers are associated with intrinsic MDR1 gene expression. *Nat. Med.* **3**, 447-450.
- Beck WT., Grogan TM., Willam CL., Cordon-Cardo C., Parham DM., Boyett JF., Andreeff M., Bates SE., Berard CW., Boyett JM., Brophy NA., Broxterman HJ., Chan HS., Dalton WS., Dietel

- M., Fojo AT., Gasoyne RD., Head D., Houghton P., Srivastava J., Lehnert DK., Leuth CP., Paietta E., Pavelic ZP., Weinstein R. (1996). Methods to detect P-glycoprotein-associated multidrug resistance in patients tumors: consensus recommendations. *Cancer Res.* **56**, 3010-3020.
- Bergelson JM., Krithivas A., Celi L., Groguett G., Horwitz MS., Wickham T., Crowell RL., Finberg RW. (1998). The murine CAR homolog is a receptor for coxsackie B virus and adenoviruses. *J. Virol.* **72**, 415-419.
- Berget S., Moore C., Sharp P. (1977). Spliced segments at the 5' terminus of adenovirus 2 late mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **74**, 3171-3175.
- Berk AJ. (2005). Recent lessons in gene expression, cell cycle control, and cell biology from adenovirus. *Oncogene* **24**, 7673-7685.
- Berk AJ., Lee F., Harrison T., Williams J., Sharp PA. (1979). Pre-early adenovirus 5 gene product regulates synthesis of early viral messenger RNAs. *Cell* **17**, 935-944.
- Berk AJ., Sharp P. (1978). Structure of the Adenovirus 2 Early mRNAs. *Cell* **14**, 695-711.
- Bewley MC., Springer K., Zhang YB., Freimuth P., Flanagan JM. (1999). Structural analysis of the mechanism of adenovirus binding to its human cellular receptor, CAR. *Science* **286**, 1579-1583.
- Biedler JL., and Riehm H. (1970). Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic, and cytogenetic studies. *Cancer Res.* **30**, 1174-1184.
- Bieler A., Mantwill K., Dravits T., Bernshausen A., Glockzin G., Köhler-Vargas N., Lage H., Gansbacher B., Holm PS. (2006). Novel three-pronged strategy to enhance cancer cell killing in glioblastoma cell lines: histone deacetylase inhibitor, chemotherapy, and oncolytic adenovirus dl520. *Human Gene Ther.* **17**, 55-70.
- Birnboim HC., and Doly J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7**, 1513-1523.
- Brummelkamp TR., Bernards R., Agami R. (2002). A system for stable expression of short interfering RNAs in mammalian cells. *Science* **296**, 550-533.
- Chaires JB, Dattagupta N, Crothers DM. (1982). Studies on interaction of anthracyclines acid: Equilibration binding studies on interaction of daunomycin with deoxyribonuclein acid. *Biochemistry* **21**, 3933-3940.

- Chan HS., Haddad G., Thorner PS., DeBoer Lin YP., Ondrusek N. Yeager H., Ling V. (1991). P-glycoprotein expression as a predictor of the outcome of therapy for neuroblastoma. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1608-1614.
- Chan HS., Thorner PS., Haddad G., Ling V. (1990). Immunohistochemical detection of P-glycoprotein: prognostic correlation in soft tissue sarcoma of childhood. *J. Clin. Oncol.* **8**, 689-704.
- Chandra P. and Brouwer KL. (2004). The complexities of hepatic drug transport: current knowledge and emerging concepts. *Pharm. Res.* **21**, 719-735.
- Chaudhary PM., Roninson IB. (1993). Induction of multidrug resistance in human cells by transient exposure to different chemotherapeutic drugs. *J. Natl. Cancer Inst.* **85**, 632-639.
- Chen CY., Gherzi JS., Andersen JS., Gaietta G., Jurchott K., Royer HD., Mann M., Karin M. (2000). Nucleolin and YB-1 are required for JNK-mediated interleukin-2 mRNA stabilization during T-cell activation. *Genes Dev.* **14**, 1236-1248.
- Combates NJ., Kwon PO., Rzepka RW., Cohen D. (1997). Involvement of the transcription factor NF-IL6 in phorbol ester induction of P-glycoprotein in U937 cells. *Cell Growth Differ.* **8**, 213-219.
- Dean M., Rzhetsky A., Allikmets R. (2001). The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily. *Genome Res.* **11**, 1156-1166.
- Dean M., Fojo T., Bates S. (2005). Tumour stem cells and drug resistance. *Nature Rev. Cancer* **5**, 275-284.
- Didier DK., Schiffenbauer J., Woulfe SL., Zacheis M., Schwartz BD. (1988). Characterization of the cDNA encoding a protein binding to the major histocompatibility complex II Y box. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **85**, 7322-7326.
- Dieckmann-Schuppert A., Schnittler H. (1996). A simple assay for quantification of protein in tissue sections, cell cultures, and cell homogenates, and of protein immobilized on solid surfaces. *Cell Tissue Res.* **288**, 119-126.
- Dietel M., Arps H., Lage H., Niendorf A. (1990). Membrane vesicle formation due to acquired mitoxantrone resistance in human gastric cell line EPG85-257. *Cancer Res.* **50**, 6100-6106.
- Dobbelstein M., Roth J., Kimberly W.T., Levine A.J., Shenk T. (1997). Nuclear export of the E1B-55kD and E4-34kD adenoviral oncogenes mediated by a rev-like signal sequence. *EMBO J.* **16**, 4276-4284.
- Doerfler W. (1983). The Molecular Biology of Adenoviruses. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.*, New York, Springer, 109-111.

- Dombrowski SM, Desai SY, Marroni M, Cucullo L, Goodrich K, Bingaman W, Mayberg MR, Benghez L, Janigro D. (2001). Overexpression of multiple drug resistance genes in endothelial cells from patients with refractory epilepsy. *Epilepsia* **42**, 1501-1506.
- Dykxhoorn DM, Novina CD, Sharp PA. (2003). Killing the messenger: short RNAs that silence gene expression. *Nature Revs. Mol. Cell. Biol.* **4**, 457-467.
- Elbashir SM, Harborth J, Lendeckel W, Yalcin A, Weber K, Tuschl T. (2001). Duplexes of 21-nucleotide RNAs mediate RNA interference in cultures mammalian cells. *Nature* **411**, 494-498.
- Evdokimova VM, Kovrigina EA, Nashchekin DV, Davydova EK, Hershey JW, Ovchinnikov LP. (1998). The major core protein of messenger ribonucleoprotein particles (p50) promotes initiation of protein biosynthesis in vitro. *J Biol Chem.* **273**, 3574-3581.
- Fields BN, Kniepe DM, Chanock RM, Hirsch MS, Melnick JL, Monath TP, Roizman B. (1990). Adenoviridae and their replication. *Virology*, New York, Raven Press, 167-172
- Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998). Potent and Specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **391**, 806-811.
- Flint J, Broker TR. (1981). Lytic infection by adenoviruses. In: Tooze, J.: *Molecular Biology of Tumor Viruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York. 443-547.
- Fricker SP, and Buckley RG. (1996). Comparison of two colorimetric assays as cytotoxicity endpoints for an in vitro screen for antitumour agents. *Anticancer Res.* **16**, 3755-3760.
- Gey GD, Coffman WD, Kubicek MD. (1952). Tissue culture studies of the proliferative capacity of cervical carcinoma and normal epithelium. *Cancer Re.* **12**, 264-265
- Goding CR, Temperley SM, Fisher F. (1987). Multiple transcription factors interact with the adenovirus-2 EII-late promoter: evidence for a novel CCAAT recognition factor. *Nucleic Acids Res.* **15**, 7761-7780.
- Goldsmith ME, Madden MJ, Morrow CS, Cowan KH. (1993). A Y-box consensus sequence is required for basal expression of the human multidrug resistance (mdr1) gene. *J Biol Chem.* **268**, 5856-5860.
- Goldstein LJ, Galski H, Fojo A, Willingham M, Lai SL, Gazdar A, Pirker R, Green A, Crist W, Brodeur GM, Lieber M, Cossman J, Gottesman MM, Pastan I. (1989). Expression of a multidrug resistance gene in human cancers. *J. Natl. Cancer Inst.* **81**, 116-124.

- Goodfellow IG, Evans DJ, Blom AM, Kerrigan D, Miners JS, Morgan BP, Spiller OB. (2005). Inhibition of Coxsackie B virus infection by soluble forms of its receptors: binding affinities, altered particle formation, and competition with cellular receptors. *J. Virol.* **18**, 12016-12024.
- Gooding LR, Elmore LW, Tollefson AE, Brady HA, Wold WS. (1988). A 14,700 MW protein from the E3 region of adenovirus inhibits cytolysis by tumor necrosis factor. *Cell* **53**, 341-346.
- Graat HC, Wuisman PI, van Beusechem VW, Carette JE, Gerritsen WR, Bras J, Schaap GR, Kaspers GJ, Ogoose A, Gu W, Kawashima H, Hotta T. (2005). Coxsackievirus and adenovirus receptor expression on primary osteosarcoma specimens and implications for gene therapy with recombinant adenoviruses. *Clin. Cancer Res.* **10**, 3831-3838.
- Graham FL. (1984). Transformation by and oncogenicity of human adenoviruses. In: The adenoviruses, HS. Ginsberg. Plenum Press, New York, 339-398.
- Graham FL, Smiley J, Russel WC, Nairn R. (1977). Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol* **36**, 59-74.
- Graham FL, van der Eb AJ. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology* **52**, 456-467.
- Grant CE, and Deeley RD. (1993). Cloning and characterization of chicken YB-1: regulation of expression in the liver. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 4186-4196.
- Greber UF, Willetts M, Webster P, Helenius A. (1993). Stepwise dismantling of adenovirus 2 during entry into cells. *Cell* **75**, 477-486.
- Haas S, Thatikunta P, Steplewski A, Johnson EM, Khalili K, Amini S. (1995). A 39-kD DNA-binding protein from mouse brain stimulates transcription of myelin basic protein gene in oligodendrocytic cells. *J. Cell Biol.* **130**, 1171-1179.
- Han J, Modha D, White E. (1998). Interaction of E1B 19K with Bax is required to block Bax-induced loss of mitochondrial membrane potential and apoptosis. *Oncogene* **17**, 2993-3005.
- Hannon GJ. (2002). RNA interference. *Nature* **418**, 244-251.
- Hao DL, Liu CM, Dong WJ, Gong H, Liu XS. (2005). Knockdown of human p53 gene expression in 293-T cells by retroviral vector mediated short hairpin RNA. *Acta Biochem Biophys. Sin.* **73**, 779-783.
- Harborth J, Elbashir SM, Bechert K, Tuschl T, Weber K. (2001). Identification of essential genes in cultured mammalian cells using small interfering RNAs. *J. Cell Sci.* **114**, 4557-4565.

- Heise CC., Williams AM., Xue S., Propst M., Kim DH. (1999). Intravenous administration of ONYX-015, a selectively replicating adenovirus, induces antitumoral efficacy. *Cancer Res.* **59**, 2623-2628.
- Hemminki A., Kanerva A., Liu B., Wang M., Alvarez RD., Siegal GP., Curiel DT. (2003). Modulation of Coxsackie-Adenovirus Receptor Expression for Increased Adenoviral Transgene Expression. *Cancer Res.* **63**, 847-853.
- Hengstermann A., Whitaker NJ., Zimmer D., Zentgraf H., Scheffner M. (1998). Characterization of sequence elements involved in p53 stability regulation reveals cell type dependence for p53 degradation. *Oncogene* **17**, 2933-2941.
- Hermiston TW., Tripp RA., Sparer T., Gooding LR., Wold WS. (1993). Deletion mutation analysis of the adenovirus type 2 E3-gp19K protein: identification of sequences within the endoplasmic reticulum luminal domain that are required for class I antigen binding and protection from adenovirus-specific cytotoxic T lymphocytes. *J. Virol.* **67**, 5289-5298.
- Hillen W., Berens C. (2002) Tetracyclin-gesteuerte Genregulation: Vom bakteriellen Ursprung zum eukaryotischen Werkzeug *Biospektrum* **4**, 355-358.
- Hitt M., Bett AJ., Addison CL., Prevec L., Graham FL. (1995). Techniques for human adenovirus vector construction and characterization. *Meth. Mol. Gen.* **7**, 13-30.
- Holm PS., Lage H., Bergmann S., Jurchott K., Glockzin G., Bernshausen A., Ladhoff A., Mantwill K., Wichert A., Mymryk JS., Ritter T., Dietel M., Gansbacher B., Royer HD. (2004). Multidrug-resistant cancer cells facilitate E1-independent adenoviral replication: impact for cancer gene therapy. *Cancer Res.* **64**, 322-328.
- Holm PS., Scanlon KJ., Dietel M. (1994). Reversion of multidrug resistance in the P-glycoprotein-positive human pancreatic cell line (EPP85-181RDB) by introduction of a hammerhead ribozyme. *Br. J Cancer* **70**, 239-243.
- Huang XW., Tang ZY., Lawrence TS., Zhang M. (2005). 5-Fluorouracil and hydroxyurea enhance adenovirus-mediated transgene expression in colon and hepatocellular carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **131**, 184-190.
- Huesker M., Folmer Y., Schneider M., Fulda C., Blum HE., Hefkemeyer P. (2002). Reversal of drug resistance of hepatocellular carcinoma cells by adenoviral delivery of anti-MDR1 ribozymes. *Hepatology* **36**, 874-884.
- Ichikawa T. and Chiocca EA. (2001). Comparative analysis of transgene delivery and expression in tumors inoculated with a replication-conditional or -defective viral vector. *Cancer Res.* **61**, 5336-5339.

- Ikeda MA. And Nevins JR. (1993). Identification of distinct roles for separate E1A domains in disruption of E2F complexes. *Mol. Cell Biol.* **13**, 7029-7035.
- Ilan Y., Droguett G., Chowdhury NR., Li Y., Sengupta K., Thummala NR., Davidson A., Chowdhury JR., Horwitz MS. (1997). Insertion of the adenoviral E3 region into a recombinant viral vector prevents antiviral humoral and cellular immune responses and permits long-term gene expression. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 2587-2592.
- Izumi H., Toshihiro I., Nagatani G., Ise T., Murakami T., Uramoto H., Torigoe T., Ishiguchi H., Yoshida Y., Nomoto M., Okamoto T., Uchiumi T., Kuwano M., Funa K., Kimitoshi K. (2001). Y-box-binding protein-1 binds preferentially to single-stranded nucleic acids and exhibits 3'-5' exonuclease activity. *Nucleic Acids Res.* **29**, 1200-1207.
- Jacque J.-M., Triques K., Stevenson M. (2002). Modulation of HIV-1 replication by RNA interference. *Nature* **418**, 435-438.
- Janz M., Harbeck N., Dettmar P., Berger U., Schmidt A., Jurchott K., Schmitt M., Royer HD. (2002). Y-box factor YB-1 predicts drug resistance and patient outcome in breast cancer independent of clinically relevant tumour biologic factors HER2, uPA and PAI-1. *Int. J. Cancer* **97**, 278-282.
- Johnson DR., Finch RA., Lin ZP., Zeiss CJ., Sartorelli AC. (2001). The pharmacological phenotype of combined multidrug-resistance *mdr1a/1b*- and *mrp1*-deficient mice. *Cancer Res.* **61**, 1469-1476.
- Jurchott K., Bergmann S., Stein U., Walther W., Janz M., Manni I., Piaggio G., Fietze E., Dietel M., Royer HD. (2003). YB-1 as a cell cycle-regulated transcription factor facilitating cyclin A and cyclin B1 gene expression. *J. Biol. Chem.* **278**, 27988-27996.
- Kamura T., Yahata H., Amada S., Ogawa S., Sonoda T., Kobayashi H., Mitsumoto M., Kohno K., Kuwano M., Nakano H. (1999). Is nuclear expression of Y-box-binding protein-1 a new prognostic factor in ovarian serous adenocarcinoma? *Cancer* **85**, 2450-2454.
- Kappel S., Matthes Y., Zimmer B., Kaufmann M., Strebhardt K. (2006). Tumor inhibition of genomically integrated inducible RNAi cassettes. *Nucleic Acids Res.* **34**, 4527-4536.
- Kashanchi F., Duvall JF., Dittmer J., Mireskandari A., Reid RL., Gitlin SD., Brady JN. (1994). Involvement of transcription factor YB-1 in human T-cell lymphotropic virus type I basal gene expression. *J. Virol.* **68**, 561-565.
- Kawabe T., Chen ZS., Wada M., Uchiumi T., Ono M., Akiyama S., Kuwano M. (1999). Enhanced transport of anticancer agents and leukotriene C4 by the human canalicular multispecific organic anion transporter (cMOAT/MRP2). *FEBS Lett.* **456**, 327-331.

- Ketting RF., Fischer SE., Bernstein E., Sijen T., Hannon GJ., Plasterk RH. (2001). Dicer functions in RNA interference and in synthesis of small RNA involved in developmental timing in *C. elegans*. *Genes Dev.* **15**, 2654-2659.
- Kobayashi H., Dorai T. Holland JF., Ohnuma T. (1994). Reversal of drug sensitivity in multidrug-resistant tumor cells by an MDR1 (PGY1) ribozyme. *Cancer Res.* **54**, 1271-1275.
- Kohno K., Izumi H., Uchiumi T., Ashizuka M., Kuwano M. (2003). The pleiotropic functions of the Y-box-binding protein, YB-1. *Bioessays* **25**, 691-698.
- Kohno K., Sato H., Takano K., Kuwano M. (1989). The direct activation of human multidrug resistance gene (MDR1) by anticancer agents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **165**, 1415-1421.
- Kohno K., Tanimura H., Sato S., Nakayama Y., Makino Y., Wada M., Fojo AT., Kuwano M. (1994). Cellular control of human multidrug resistance 1 (MDR1) gene expression in absence and presence of gene amplification in human cancer cells. *J. Biol. Chem.* **269**, 20503-20508.
- Koike K., Kawabe T., Tanaka T., Toh S., Uchiumi T., Wada M., Akiyama S., Ono M., Kuwano M. (1997). A canalicular multispecific anion transporter (cMOAT) antisense cDNA drug sensitivity in human hepatic cancer cells. *Cancer Res.* **57**, 5475-5479.
- Koike K., Uchiumi T., Ohga T., Toh S., Wada M., Kohno K., Kuwano M. (1997). Nuclear translocation of the Y-Box binding protein by ultraviolet irradiation. *FEBS Lett.* **417**, 390-394.
- Kowalski P., Surowiak P., Lage H. (2005). Reversal of different drug-resistant phenotypes by an autocatalytic multitarget multiribozyme directed against the transcripts of the ABC transporters MDR1/P-gp, MRP2, and BCRP. *Mol. Ther.* **11**, 508-522.
- Krajcsi P. and Wold WS. (1992). The adenovirus E3-14.5K protein which is required for prevention of TNF cytolysis and for down-regulation of the EGF receptor contains phosphoserine. *Virology* **187**, 492-498.
- Krakoff IH., Brown NC., Reichard P. (1968). Inhibition of ribonucleotide diphosphate reductase by hydroxyurea. *Cancer Res.* **28**, 1559-1565.
- Kueng W., Silber E., Eppenberger U. (1989). Quantification of cells cultured on 96-well plates. *Anal. Biochem.* **182**, 16-19.
- Kuhn AN., and Käufer NF. (2002). Mechanism and control of pre-mRNA slicing. In: Molecular biology of *Schizosaccharomyces pombe* Berlin, Springer.

- Kuwano M., Uchiumi T., Hayakawa H., Ono M., Wada M., Izumi H., Kohno K. (2003). The basic and clinical implications of ABC transporters, Y-box-binding protein-1 (YB-1) and angiogenesis-related factors in human malignancies. *Cancer Sci.* **94**, 9-14.
- La Teana A., Brandi A., Falconi M., Spurio R., Pon CL., Gualerzi CO. (1991). Identification of a cold shock transcriptional enhancer of the *Escherichia coli* gene encoding nucleoid protein H-NS. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88**, 10907-10911.
- Ladomery M., Sommerville J. (1995). A role of Y-box proteins in cell proliferation. *Bioessays* **17**, 9-11.
- Laemmli U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**, 680-685.
- Lage H. (2006). MDR1/P-glycoprotein (ABCB1) as target for RNA interference-mediated reversal of multidrug resistance. *Curr. Drug Targets.* **7**, 813-21.
- Lage H., Dietel M. (2002). Multiple mechanisms confer different drug-resistant phenotypes in pancreatic carcinoma cells. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 349-357.
- Lander et al. (2001). Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lasham A., Lindridge E., Rudert F., Onrust R., Watson J. (2000). Regulation of the human fas promoter by YB-1, Puralpha and AP-1 transcription factors. *Gene* **252**, 1-13.
- Lasham A., Moloney S., Hale T., Homer C., Zhang YF., Murison JG., Braithwaite AW, Watson J. (2003). The Y-box-binding protein, YB1, is a potential negative regulator of the p53 tumor suppressor. *J. Biol. Chem.* **278**, 35516-35523.
- Leopold PL., Kreitzer G., Miyazawa N., Rempel S., Pfister KK., Rodriguez-Boulan E., Crystal RG. (2000). Dynein- and microtubule-mediated translocation of adenovirus serotype 5 occurs after endosomal lysis. *Hum. Gene. Ther.* **11**, 151-156.
- Lichtenstein DL., Doronin K., Toth K., Kuppaswamy M., Wold WS., Tollefson AE. (2004). Adenovirus E3-6.7K Protein Is Required in Conjunction with the E3-RID Protein Complex for the Internalization and Degradation of TRAIL Receptor 2. *J. Virol.* **78**, 12297-12307.
- Lincke CR., van der Blick AM., Schurhuis GJ., van der Velde Koerts T., Smit JJ., Borst P. (1990). Multidrug resistance phenotype of human BRO melanoma cells transfected with a wild-type human *mdr1* complementary DNA. *Cancer Res.* **50**, 1779-1785.
- Liu C., Qureshi IA., Shan Y., Huang Y., Xie Y., Ji M. (1996). Modulation of multidrug resistance gene (*mdr1*) with antisense oligodeoxynucleotides. *Clin. Sci. (Lond.)* **91**, 93-98.

- Lukas J., Muller H., Bartkova J., Spitkovsky D., Kjerulff AA., Jansen-Durr P., Strauss M., Bartek J. (1994). DNA tumor virus oncoproteins and retinoblastoma gene mutations share the ability to relieve the cell's requirement for cyclin D1 function in G1. *J. Cell Biol.* **125**, 625-638.
- Lutz M., Wempe F., Bahr I., Zopf D., von Melchner H. (2006). Proteasomal degradation of the multifunctional regulator YB-1 is mediated by a F-Box protein induced during programmed cell death. *FEBS Letters* **16**, 3921-3930.
- Martin TA., Watkins G., Jiang WG. (2005). The Coxsackie-adenovirus receptor has elevated expression in human breast cancer. *Clin. Exp. Med.* **5**, 122-128.
- Materna V., Liedert B., Thomale J., Lage H. (2005). Protection of platinum-DNA adduct formation and reversal of cisplatin resistance by anti-MRP2 hammerhead ribozymes in human cancer cells. *Int. J. Cancer* **115**, 393-402.
- Materna V., Stege A., Surowiak P., Pribsch A., Lage H. (2006). RNA interference-triggered reversal of ABCC2-dependent cisplatin resistance in human cancer cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **348**, 153-157.
- McManus MT., Petersen CP., Haines BB., Chen J., Sharp PA. (2002). Gene silencing using micro-RNA designed hairpins. *RNA* **8**, 842-850.
- Mealey K., Barhoumi R., Burghardt R., Safe S., Kochevar D. (2002). Doxycycline induces expression of P-glycoprotein in MCF-7 breast carcinoma cells. *Antimicrob. Agents Chemother.* **46**, 755-761.
- Mikaelian I., and Sergeant A. (1992). A general and fast method to generate multiple site directed mutations. *Nucleic Acids Res.* **20**, 376-379.
- Minemura M., Tanimura H., Tabor E. (1999). Overexpression of multidrug resistance genes MDR1 and cMOAT in human hepatocellular carcinoma and hepatoblastoma cells lines. *Int. J. Oncol.* **15**, 559-563.
- Mittereder N., March KL., Trapnell BC. (1996). Evaluation of the concentration and bioactivity of adenovirus vectors for gene therapy. *J. Virol.* **70**, 7498-7509.
- Montani V., Taniguchi SI., Shong M., Suzuki K., Ohmori M., Giulani C., Napolitano G., Saji M., Fiorentino B., Reimold AM., Ting JP., Kohn LD., Singer DS. (1998). Major histocompatibility class II HLA-DR gene expression in thyrocytes: counter regulation by class II transactivator and the thyroid Y-box protein. *Endocrinology* **139**, 280-289.
- Morgan RA., Anderson WF. (1993). Human gene therapy. *Annu. Rev. Biochem.* **62**, 191-217.

- Morrow CS. (1997). Cancer medicine. In: Holland J.F., Bast R.C., Mortin D.L. Frei E., Kufe D.W., Weichselbaum RR., Baltimore, Wiliams & Wilkins Co., **4th ed.**, 799-815.
- Müller U. (2005). Entwicklung zweier stabiler, induzierbarer Tumorzelllinien zur Reprimierung des Y-box-binding Proteins (YB-1) mit Hilfe der RNA-Interferenz. *Diplomarbeit*
- Muller C., Laurent G., Ling V. (1995). P-glycoprotein stability is affected by serum deprivation and high cell density in multidrug-resistant cells. *J. Cellular Physiol.* **163**, 538-544.
- Nakagawa M., Emoto A., Nasu N., Hanada T., Kuwano M., Cole SPC., Nomura Y. (1997). Clinical significance of multi-drug resistance associated protein and P-glycoprotein in patients with bladder cancer. *J. Urol.* **157**, 1260-1265.
- Nevins JR. (1981). Mechanism of activation of early viral transcription by the adenovirus E1A gene product. *Cell* **26**, 213-220.
- Nieth C., Pribsch A., Stege A., Lage H. (2003). Modulation of the classical multidrug resistance (MDR) phenotype by RNA interference (RNAi) *FEBS Lett.* **545**, 144-150.
- Obert S., O'Connor RJ., Schmid S., Hearing P. (1994). The adenovirus E4 6/7 protein transactivates the E2 promoter by inducing dimerization of a heteromeric E2F complex. *Mol. Cell. Biol.* **14**, 1333-1346.
- Oda Y., Ohishi Y., Saito T., Hinoshita E., Uchiumi T., Kinukawa N., Iwamoto Y., Kohno K., Kuwano M., Tsuneyoshi M. (2003). Nuclear expression of Y-box-binding protein-1 correlates with P-glycoprotein and topoisomerase IIa expression, and with poor prognosis in synovial sarcoma. *J. Pathol.* **199**, 251-258.
- Oda Y., Sakamoto A., Shinohara N., Ohga T., Uchiumi T., Kohno K., Tsuneyoshi M., Kuwano M., Iwamoto Y. (1998). Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human osteosarcoma. *Clin. Cancer Res.* **4**, 2273-2277.
- Ohga T., Koike K., Ono M., Makino Y., Itagaki Y., Timoto M. Kuwano M., Kohno K. (1996). Role of the human Y-box-binding protein YB-1 in cellular sensitivity to the DNA-damaging agents cisplatin, mytomyacin C and ultraviolet light. *Cancer Res.* **56**, 4224-4228.
- Ohga T., Uchiumi T., Makino Y., Koike K., Wada M., Kuwano M., Kohno K. (1998). Direct involvement of the Y-box binding protein YB-1 in genotoxic stress-induced activation of the human multidrug resistance 1 gene. *J. Biol. Chem.* **273**, 5997-6000.
- Oi K., Davies WR., Tazelaar HD., Bailey KR., Federspiel MJ., Russell SJ., McGregori CG. (2006). Ex vivo hypothermic recirculatory adenoviral gene transfer to the transplanted pig heart. *J. Gene Med.* **8**, 795-803.

- Osborn MT., Chambers TC. (1996). Role of the stress-activated c-Jun NH₂-terminal protein kinase pathway in the cellular response to adriamycin and other chemotherapeutic drugs. *J. Biol. Chem.* **271**, 30950-30955.
- O'Shea C., Klupsch K., Choi S., Bagus B., Soria C., Shen J., McCormick F., Stokoe D. (2005). Adenoviral proteins mimic nutrient/growth signals to activate the mTOR pathway for viral replication. *EMBO J.* **24**, 1211-1221.
- Pastan I., and Gottesman MM. (1987). Multiple-drug resistance in human cancer. *N. Engl. J. Med.* **316**, 1388-1393.
- Paule MR., and White RJ. (2000). Survey and summary: transcription by RNA polymerases I and III. *Nucleic Acids Res.* **28**, 1283-1298.
- Philipson L. (1983). Structure and assembly of adenovirus. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **109**, 1-53.
- Pirker R., Wallner J., Geissler K., Linkesch W., Haas OA., Bettelheim P., Hopfner M., Scherrer R., Valent O., Havelec L. (1991). MDR1 gene expression and treatment outcome in acute myeloid leukemia. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 708-712.
- Plasterk RH. (2002). RNA silencing: the genome's immune system. *Science* **296**, 1263-1265.
- Priebsch A., Rompe F., Tonnies H., Kowalski P., Surowiak P., Stee A., Materna V., Lage H. (2006). Complete reversal of ABCG2-depending atypical multidrug resistance by RNA interference in human carcinoma cells. *Oligonucleotides* **16**, 263-74.
- Prokipcak RD., Raouf A., Lee C. (1999). The AZ-rich 3' untranslated region of human MDR1 mRNA is an inefficient mRNA destabilizer. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **261**, 627-634.
- Raj GV., Safak M., Mac Donald GH., Khalili K. (1996). Transcriptional regulation of human polyomavirus JC: evidence for a functional interaction between RelA (p65) and the Y-box binding protein, YB-1. *J. Virol.* **70**, 5944-5953.
- Rauen KA., Sudilovsky D., Le JL., Chew KL., Hann B., Weinberg V., Schmitt LD., McCormick F. (2002). Expression of the coxsackie adenovirus receptor in normal prostate and in primary and metastatic prostate carcinoma: potential relevance to gene therapy. *Cancer Res.* **62**, 3812-3818.
- Rein DT., Breidenbach M., Wu H., Han T., Haviv Y., Wang M., Kirby TO. (2004). Gene transfer to cervical cancer with fiber-modified adenoviruses. *Int. J. Cancer* **111**, 698-704.
- Roelvink PW., Mi Lee G., Einfeld DA., Kovesdi I., Wickham TJ. (1999). Identification of a conserved receptor-binding site on the fiber proteins of CAR-recognizing adenoviridae. *Science* **286**, 1568-1571.

- Ros JE., Libbrecht L., Geuken M., Jansen PL., Roskams TA. (2003). High expression of MDR1, MRP1, and MRP3 in the hepatic progenitor cell compartment and hepatocytes in severe human liver disease. *J. Pathol.* **200**, 553-560.
- Russell, WC. (2000). Update on Adenovirus and its vectors. *J. Gen. Virol.* **81**, 2573-2604
- Sachs MD., Ramamurthy M., Poel H., Wickham TJ., Lamfers M., Gerritsen W., Chowdhury W., Li Y., Schoenberg MP., Rodriguez R. (2004). Histone deacetylase inhibitors upregulate expression of the coxsackie-adenovirus receptor (CAR) preferentially in bladder cancer cells. *Cancer Gene Ther.* **11**, 477-486.
- Saji H., Toi M., Koike M., Kohno K., Kuwano M. (2003). Nuclear expression of YB-1 protein correlates with P-glycoprotein expression in human breast carcinoma. *Cancer Lett.* **192**, 191-197.
- Sakura H., Maekawa T., Imamoto F., Yasuda K., Ishii S. (1988). Two human genes isolated by a novel method encode DNA-binding proteins containing a common region of homology. *Gene* **73**, 499-507.
- Sanger F., Nicklen S., Coulsen AR. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **74**, 5463-5467.
- Scherr M., Battmer K., Schultheis B., Ganser A., Eder M. (2005). Stable RNA interference (RNAi) as an option for anti-bcr-abl therapy. *Gene Ther.* **12**, 12-21.
- Schinkel AH. (1997). The physiology function of drug-transporting P-glycoproteins. *Sem. Cancer Biol.* **8**, 161-170.
- Sellers WR., Rodgers JW., Kaelin WG. (1995). A potent transrepression domain in the retinoblastoma protein induces a cell cycle arrest when bound to E2F sites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **92**, 11544-11548.
- Shibahara K., Sugio K., Osaki T., Uchiumi T., Maehara Y., Kohno K., Yasumoto K., Sugimachi K., Kuwano M. (2001). Nuclear expression of the Y-box binding protein, YB-1, as a novel marker of disease progression in non-small lung cancer. *Clin. Cancer Res.* **7**, 3151-3155.
- Shibao K., Takano H., Nakayama Y., Okazaki K., Nagata N., Izumi H., Uchiumi T., Kuwano M., Kohno K., Itoh H. (1999). Enhanced coexpression of YB-1 and DNA topoisomerase IIa genes in human colorectal carcinomas. *Int. J. Cancer* **83**, 732-737.
- Skehan P., Storeng R., Scudiero D., Monks A., McMahon J., Vistica D., Warren JT., Bokesch H., Kenny S., Boyd MR. (1990). New colorimetric cytotoxicity assay for anticancer-drug screening. *J. Natl. Cancer Inst.* **82**, 1107-1112.
- Somia N., and Verma IM. (2000). Gene Therapy: trials and tribulations. *Nat. Rev. Genet.* **1**, 91-99.

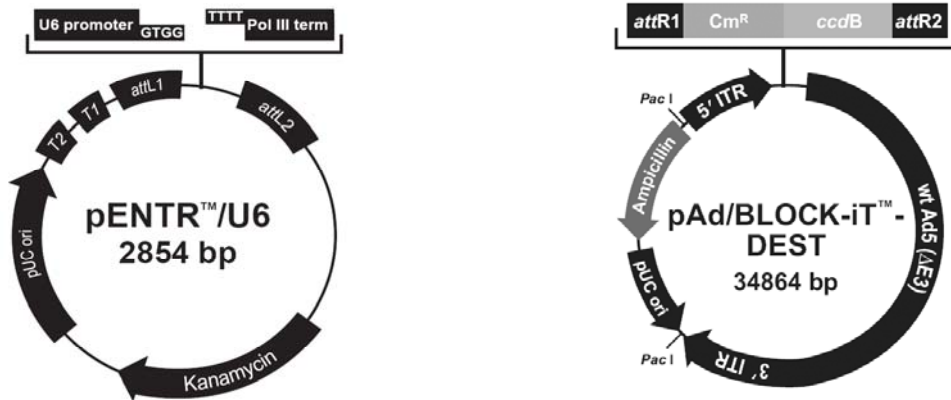
- Sommerville J. (1999). Activities of cold shock domain proteins in translation control. *Bioessays* **21**, 319-325.
- Soop T., Nashchekin D., Zhao J. (2003). Ap50-like Y-box protein with a putative translational role becomes associated with pre-mRNA concomitant with transcription. *J. Cell. Sci.* **116**, 1493-1503.
- Spitkovskii DD., Roier GD., Mazurenko NN., Mikhaleva II., Prudchenko IA., Korgukh IA. (1993). In vivo identification of YB-1 protein, interacting with the enhancer of human papillomavirus (HPV) type 18, using antibodies to a synthetic peptide. *Mol. Biol. (Mosk)* **27**, 81-91.
- Stege A., Pribsch A., Nieth C., Lage H. (2004). Stable and complete overcoming of MDR1/P-glycoprotein-mediated multidrug resistance in human gastric carcinoma cells by RNA interference. *Cancer Gene Ther.* **11**, 699-706.
- Stein U., Jurchott K., Walther W., Bergmann S., Schlag PM., Royer HD. (2001). Hyperthermia-induced nuclear translocation of transcription factor YB-1 leads to enhanced expression of multidrug resistant-related ABC transporters. *J. Biol. Chem.* **276**, 28562-28569.
- Stein U., Walther W., Shoemaker R.H. (1996). Vincristin induction of mutant and wild-type human multidrug resistance promoters is cell-type specific and dose-dependent. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **122**, 257-282.
- Stuart DD., Kao GY., Allen TM. (2000). A novel, long-circulating, and functional liposomal formulation of antisense oligodeoxynucleotides targeted against MDR1. *Cancer Gene Ther.* **7**, 466-475.
- Swamynathan K., Varma BR., Weber KT., Guntaka RV. (2002). Targeted disruption of one allele of the Y-box protein gene, Chk-YB-1b, in DT40 cells results in major defects in cell cycle. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **296**, 451-457.
- Swamynathan S., and Thimmapaya B. (1995). Regulation of adenovirus E2 transcription unit. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* **199**, 177-194.
- Swamynathan S., and Thimmapaya B. (1996). Transactivation of adenovirus E2-early promoter by E1A and E4 6/7 in the context of viral chromosome. *J. Mol. Biol.* **258**, 736-746.
- Szakács G., Paterson JK., Ludwig JA., Booth-Genthe C., Gottesman MM. (2006). Targeting multidrug resistance in cancer. *Nat. Rev. Drug. Discov.* **5**, 219-234.
- Taniguchi K., Wada M., Kohno K., Nakamura T., Kawabe T., Kawakami M., Kagotani K., Okumura K., Akiyama S., Kuwano M. (1996). A human canalicular multispecific organic anion transporter (sMOAT) gene is overexpressed in cisplatin-resistant human cancer cell lines with decreased drug accumulation. *Cancer Res.* **56**, 4124-4129.

- Tanimura H., Kohno K., Sato SI., Uchiumi T., Miyazaki M., Kuwano M. (1992). The human multidrug resistance 1 promoter has an element that responds to serum starvation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **183**, 917-924.
- Thiebaut F., Tsuruo T., Hamada H., Gottesman MM., Pastan I., Willingham MC. (1987). Cellular localization of the multidrug-resistance gene product P-glycoprotein in normal human tissues. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* **84**, 7735-7738.
- Thomas H., Coley HM. (2003). Overcoming multidrug resistance in cancer: an update on the clinical strategy of inhibiting P-glycoprotein. *Cancer Control* **10**, 159-165.
- Timpe JM., Verrill KC., Trempe JP. (2006). Effects of Adeno-Associated Virus on adenovirus replication and gene expression during coinfection. *Virology* **80**, 7807-7815.
- Tiscornia G., Singer O., Ikawa M., Verma IM. (2003). A general method for gene knockdown in mice by using lentiviral vectors expressing small interfering RNA. *PNAS* **100**, 1844-1848.
- Toh S., Nakamura T., Ohga T., Koike K., Uchiumi T., Wada M., Kuwano M., Kohno K. (1998). Genomic organization of the human Y-box protein (YB-1) gene. *Gene* **206**, 93-97.
- Tollefson AE., Scaria A., Hermiston TW., Ryerse JS., Wold LJ., Wold WS. (1996). The adenovirus death protein (E3-11.6K) is required at very late stages of infection for efficient cell lysis and release of adenovirus from infected cells. *J. Virol.* **70**, 2296-2306.
- Tomko RP., Xu R., Philipson L. (1997). HCAR and MCAR: the human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **94**, 3352-3356.
- Uchiumi T., Kohno K., Tanimura H., Matsuo K., Sato S., Uchida Y., Kuwano M. (1993). Enhanced expression of the human multidrug resistance 1 gene in response to UV light irradiation. *Cell Growth Differ.* **4**, 147-157.
- Van der Bliek AM., Baas F., Van der Velde-Koerts T., Biedler JL., Meyers MB., Ozols RF., Hamilton TC., Joenje H., Borst P. (1988). Genes amplified and overexpressed in human multidrug-resistant cell lines. *Cancer Res.* **48**, 5927-5932.
- Van Groenigen M., Valentijn L.J., Baas F. (1993). Identification of a functional initiator sequence in the human MDR1 promoter. *Biochem. Biophys. Acta* **1172**, 138-146.
- Venter et al. (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Verelle P., Meissonnier F., Fonck Y., Feillel V., Dionet C., Kwiatkowski F., Plagne R., Chassagne J. (1991). Clinical relevance of immunohistochemical detection of multidrug resistance P-glycoprotein in breast carcinoma. *J. Natl. Cancer Inst.* **83**, 111-116.

- Voigt W. (2005). Sulforhodamine B assay and chemosensitivity. *Methods Mol. Med.* **110**, 39-48.
- Wolffe AP., Tafuri S., Ranjan M., Familari M. (1992). The Y-box factors: a family of nucleic binding proteins conserved from Escherichia coli to man. *New Biol.* **4**, 290-298.
- Wu H., Hait W., Yang JM. (2003). Small interfering RNA-mediated suppression of MDR1 (P-Glycoprotein) restores sensitivity to multidrug-resistant cancer cells. *Cancer Res.* **63**, 1515-1519.
- Xu D., McCarty D., Fernandes A., Fisher M., Samulski RJ., Juliano RL. (2005). Delivery of MDR1 small interfering RNA by self-complementary recombinant adeno-associated virus vector. *Mol. Ther.* **11**, 523-530.
- Yague E., Armesilla AL., Harrison G., Elliott J., Sardini A., Higgins CF., Raguz S. (2003). P-glycoprotein (MDR1) expression in leukemic cells is regulated at two distinct steps, mRNA stabilization and translational initiation. *J. Biol. Chem.* **278**, 10344-10352.
- Yague E., Higgins CF., Raguz S. (2004). Complete reversal of multidrug resistance by stable expression of small interfering RNAs targeting MDR1. *Gene Ther.* **11**, 1170-1174.
- Yahata H., Kobayashi H., Kamura T. (2002). Increased nuclear accumulation of transcription factor YB-1 in acquired cisplatin-resistant ovarian cancer. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* **128**, 621-626.
- Yew PR. and Berk AJ. (1992). Inhibition of p53 transactivation required for transformation by adenovirus early 1B protein. *Nature*, **357**, 82-85.
- Zhang WW. (1999). Development and application of adenoviral vectors for gene therapy of cancer. *Cancer Gene Ther.* **6**, 113-138.

7 ANHANG

A



B

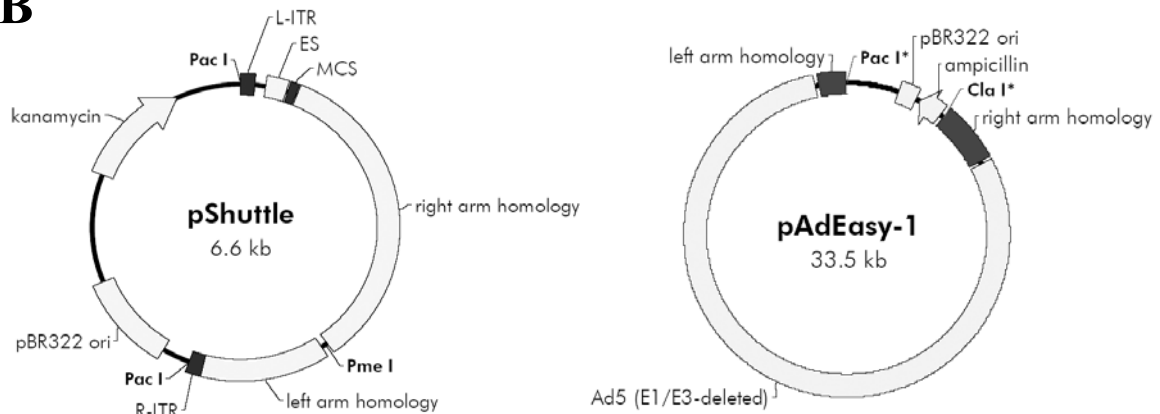


Abb. 37: Plasmide zur Konstruktion rekombinanter Adenoviren

Dargestellte Plasmide wurden wie unter 3.5.2 beschrieben zur Konstruktion von anti-MDR1 shRNA exprimierenden Adenoviren verwendet (siehe Abb. 7). **(A)** Plasmide zur Konstruktion von adenoviralen anti-MDR1 shRNA Expressionskassetten mit U6-Promotor (Invitrogen); **(B)** Plasmide zur Konstruktion von adenoviralen anti-MDR1 shRNA Expressionskassetten unter der Kontrolle eines H1-Promotors (Stratagene).

8 ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

A	Adenin	MOI	Multiplicity Of Infection
Abb.	Abbildung	mRNA	messenger RNA
Ad5	Adenovirus Subtyp C, Serogruppe 5	n	nano- (<i>nános</i>)
A.dest	Aqua destillata	nt	Nukleotid
APS	Ammoniumperoxidsulfat	OD	Optische Dichte
ATP	Adenosintriphosphat	p	Plasmid
BSA	Bovines Serumalbumin	PBGD	Porphobilinogen Deaminase
bzw.	beziehungsweise	PBS	Phosphate Buffered Saline
C	Cytosin	PCR	Polymerase Chain Reaction
ca.	circa	recL	recombination site Left
CAR	Coxsackie-Adenovirus-Rezeptor	recR	recombination site Right
cDNA	complementary Desoxyribonucleinacid	RISC	RNA Induced Silencing Complex
Da	Dalton	RNA	Ribonucleinacid
d.h.	das heißt	RNAi	RNA interference
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium	rpm	revolutions per minute
DMSO	Dimethylsulfoxid	RT	Raumtemperatur
DNA	Desoxyribonucleinacid	s	Sekunde (pars minuta secunda)
ds	double strand	siRNA	small interfering RNA
DTT	Ditheothreitol	snRNA	small nuclear RNA
ECL	Enhanced Chemoluminescence	ss	single strand
et al.	et alii	T	Thymin
FACS	Fluorescence-activated cell sorter	Tab.	Tabelle
FCS	Fetal Calf Serum	TAE	Tris-Azetat/EDTA
g	Gramm (<i>grámma</i>)	TBS	Tris Buffered Saline
G	Guanin	TE	Tris-EDTA
h	hora	Tris	Trishydroxymethylaminomethan
HEK	human embryonal kidney	U	unit
HEPES	Hydroxyethylpipeazinethansulfonsäure	U	Uracil
HRP	Horseradish Peroxidase	u.a.	unter anderem
ITR	Inverted Terminal Repeat	UV	ultraviolett
k	Kilo	V	Volt
kb	Kilobasenpaare	v.a.	vor allem
LB	Liquid Broth	v/v	volume to volume
M	Mol	w/v	weight to volume
m	milli- (millesimus)	z.B.	zum Beispiel
MEM	Eagle's Minimum Essential	°C	Grad Celsius
min	Minute (pars minuta prima)	μ	mikro
mind.	mindestens	λ	lambda (Wellenlänge)
Mio.	Million	Δ	delta (Deletion)

LEBENS LAUF

ALEXANDER KASZUBIAK

geboren am 27.01.1978

E-mail: alexander.kaszubiak@charite.de

ANSTELLUNGEN

- | | |
|-----------------|---|
| 03.2004-07.2007 | <u>Wissenschaftlicher Mitarbeiter</u>
Institut für Pathologie, Universitätsklinikum Charité, CCM,
Berlin, D |
| 09.2003-11.2003 | <u>Marketing Assistant</u>
<i>Membrane Extraction Technology Ltd.</i> , London, UK |
| 06.2000-06.2003 | <u>Wissenschaftlicher Assistent</u>
Cellpharm GmbH, Hannover, D |

AUSBILDUNG

- | | |
|-----------------|--|
| 09.2005-08.2007 | <u>Studium zum <i>Master of Business Administration</i> (MBA)</u>
<i>School of Economics</i> , Berlin, D und <i>Anglia Ruskin University</i> ,
Cambridge, UK |
| 10.1998-06.2003 | <u>Studium der Biologie (Diplom)</u>
Leibniz Universität, Hannover, D |
| 09.1984-09.1997 | Grund- und weiterführende Schulen, Abitur |

PUBLIKATIONEN

Veröffentlichungen in Fachzeitschriften

Kaszubiak A., Müller U., Surowiak P., Holm PS., Priebisch A., Lage H. (2007). Delivery of therapeutic short hairpin RNAs and oncolytic effects mediated by $\Delta E1/E3$ adenoviruses is enhanced by nuclear expressed YB-1. [in Arbeit].

Stein A., Walther W., Stege A., **Kaszubiak A.**, Fichtner I., Lage H. (2007). Complete in vivo reversal of the multidrug resistance (MDR) phenotype by jet-injection of anti-MDR1 short hairpin RNA-encoding plasmid DNA. *Molecular Therapy*. [akzeptiert].

Kaszubiak A., Holm PS., Lage H. (2007). Overcoming the classical multidrug resistance phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 short hairpin RNAs and ribozymes. *International Journal of Oncology*. [akzeptiert].

Kaszubiak A., Kupstat A., Müller U., Hausmann R., Holm PS., Lage H. (2007). Regulation of MDR1 gene expression in multidrug-resistant cancer cells is independent from YB-1. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **357**, 295-301.

Mantwill K., Köhler-Vargas N., Bernshausen A., Bieler A., Lage H., **Kaszubiak A.**, Surowiak P., Dravits T., Treiber U., Hartung R., Gansbacher B., Holm PS. (2006). Inhibition of the multidrug-resistant phenotype by targeting YB-1 with a conditionally oncolytic adenovirus: implications for combinatorial treatment regimen with chemotherapeutic agents. *Cancer Research*. **66**, 7195-7202.

Noske A., **Kaszubiak A.**, Weichert W., Sers C., Niesporek S., Koch I., Schaefer B., Sehouli J., Dietel M., Lage H., Denkert K. (2007). Specific inhibition of AKT2 by RNA interference results in reduction of ovarian cancer cell proliferation: Increased expression of AKT in advanced ovarian cancer. *Cancer Letters*. **246**, 190-200.

Kaszubiak A., Klein S., de Hoog GS., Gräser Y. (2004) Population structure and evolutionary origins of *Microsporum canis*, *M. ferrugineum* and *M. audouinii*. *Infection, Genetics and Evolution*. **4**, 179-186.

Kongressbeiträge

A. Kaszubiak, P. Surowiak, U. Müller, A. Priebisch, K. Mantwill, P.S. Holm, H. Lage (2006)
“Reversal of the MDR phenotype by adenoviral delivery of anti-MDR1 shRNAs and the oncolytic effect of replication deficient adenoviruses in multidrug-resistant tumour cells.”
8th International Adenovirus Meeting, Zürich, Schweiz

A. Kaszubiak, U. Müller, P.S. Holm, H. Lage (2007)
“Overcoming multidrug resistance (MDR) of cancer cells and the oncolytic potential of originally replication-deficient (Δ E1) adenoviruses”
Adenovirus: Basic research and application, Ulm

DANKSAGUNG

Mein ganz besonderer Dank gilt an erster Stelle Herrn Prof. Dr. Dr. Hermann Lage, Gruppenleiter am Institut für Pathologie der Charité Campus Mitte. Er gab mir durch seine sehr großzügige Unterstützung die Möglichkeit diese Arbeit anzufertigen. Seine Anregungen, sein großer Erfahrungsschatz und Pragmatismus haben mich begeistert. Darüber hinaus ermöglichte er mir die Teilnahme an zwei internationalen Adenovirus-Kongressen.

Mein besonderer Dank gilt ebenfalls PD Dr. Per Sonne Holm sowie Klaus Mantwill vom Institut für Experimentelle Onkologie und Therapieforschung am Klinikum Rechts der Isar, München, für die Einführung in die adenovirale Methodik und die unermüdliche und engagierte Betreuung während der gesamten Zeit.

Allen ehemaligen und derzeitigen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Chemoresistenz, insbesondere Dr. Alexandra Stege, Dr. Pawel Surowiak, Dr. Petra Kowalski, Dr. Verena Materna, Axel Pribsch, Ursula Müller, Stephan Kolodziej und vor allem Birgit Schaefer danke ich herzlich für angeregte Diskussionen und technische Unterstützung.

Meiner Familie gilt der größte Dank. Danke für Deine Liebe Helge. Von Herzen danke ich meiner Mutter, die mir das Studium ermöglichte und während der gesamten Forschungszeit an mich glaubte. Für sie hatte ich weniger Zeit, als ich mir gewünscht hätte.

SELBSTÄNDIGKEITSERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertationsschrift selbständig und ohne unerlaubte Hilfe verfasst habe. Es wurden keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt.

Berlin, den 19.02.07

.....
ALEXANDER KASZUBIAK